

PRODUÇÃO DE LÍPIDOS DIETÉTICOS, A PARTIR DE ÓLEO DE ARGÃO E ÓLEO DE GRAMINHA DE UVA POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

Inês Sofia Almeida Vieira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente
Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão

Júri:

**Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com
Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.**

Vogais:

**Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Associada com Agregação
do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora;
Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, Professora Adjunta Convidada
do(a) Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal.**

AGRADECIMENTOS

A elaboração da presente dissertação de mestrado não teria sido possível sem a colaboração e apoio de várias pessoas, a quem gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos:

À orientadora desta tese, a Professora Suzana Ferreira Dias, agradeço pelo apoio, amizade, otimismo e disponibilidade que sempre demonstrou, assim como, por todos os conhecimentos transmitidos durante este percurso.

À co-orientadora, a Professora Carla Tecelão, pela ajuda imprescindível durante a realização do trabalho experimental, bem como, pelo saber que transmitiu ao longo da presente tese.

À Joana Rodrigues, pela colaboração e auxílio prestado no laboratório e pela paciência no esclarecimento de dúvidas que foram surgindo no decorrer deste trabalho.

A todos os elementos docentes e não docentes do Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas (DCEB), secção de Engenharia Alimentar e Agronomia Tropical do ISA.

A todos os meus amigos e colegas que estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força e apoio.

Não poderia deixar de agradecer à minha família, que sempre me ajudou e apoiou incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

Enfim, quero demonstrar o meu agradecimento, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização desta dissertação.

A todos o meu sincero e profundo Obrigada!

RESUMO

Os MLM são triacilgliceróis (TAG) de baixo valor calórico (cerca de 5 kcal/g) que não existem na natureza e que contêm ácidos gordos de cadeia longa (L) em posição *sn*-2 e ácidos gordos de cadeia média (M), nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do esqueleto de glicerol.

No presente trabalho pretendeu-se produzir MLM, através de reações de acidólise enzimática entre os ácidos gordos livres (AGL) do óleo de argão ou do óleo de graminha de uva e o ácido caprílico (C8:0) ou o ácido cáprico (C10:0).

O óleo de argão é rico em ácido oleico (45,6 %) e linoleico (34,6 %) enquanto no óleo de graminha de uva, o ácido gordo maioritário é o linoleico (69,3 %) seguido do oleico (17,7 %).

O biocatalisador utilizado foi uma enzima não comercial *sn*-1,3 seletiva, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL) imobilizada em dois suportes diferentes: Lifetech™ AP1090M e Lifetech™ ECR1030M. As reações decorreram em reatores descontínuos, em meio livre de solvente, durante 24 horas, a diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C) e com razão molar TAG:AGL de 1:2.

Os rendimentos em TAG novos obtidos para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M foram de cerca de 80 % (m/m) para os sistemas com o C8:0 e 78 % (m/m) para os sistemas com C10:0. Nos ensaios catalisados pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M atingiu-se um rendimento em TAG novos de cerca de 50 % (m/m) para os sistemas com o C8:0 enquanto que para as reações com o C10:0, atingiram-se valores de produção de novos TAG de cerca de 70 % (m/m).

Realizaram-se ensaios de estabilidade operacional a 40 °C, durante 24 horas, em reatores descontínuos, reutilizando de forma sucessiva o mesmo biocatalisador. Assim, os valores de estabilidade mais elevados foram obtidos para os ensaios com óleo de argão e C10:0, com tempos de meia vida de 84 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e de 81 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M.

Palavras-Chave: Lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM, Acidólise, Óleo de argão, Óleo de graminha de uva, Lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*.

ABSTRACT

MLM are low calorie triacylglycerols (TAG) (5 kcal/g) that do not exist in nature and contain long chain fatty acids (L) at the *sn*-2 position and medium chain fatty acids (M), at the *sn*-1 and *sn*-3 positions of the glycerol backbone.

This study aims at the production of MLM, by enzymatic acidolysis reactions between the free fatty acids (FFA) from argan or grapeseed oils and caprylic acid (C8:0) or capric acid (C10:0).

Argan oil is rich in oleic acid (45,6 %) and linoleic (34,6 %) while in grape seed oil, the major fatty acid is linoleic (69,3 %) followed by oleic (17,7 %).

The biocatalyst used was a non-commercial *sn*-1,3 regioselective, *Rhizopus oryzae* heterologous lipase (rROL) immobilized on two different supports: Lifetech™ AP1090M and Lifetech™ ECR1030M. The reactions were performed in batch, in solvent-free systems during 24 hours at different temperatures (30, 40 and 50 °C) and molar ratio TAG:FFA of 1:2.

The yields in new TAG obtained with rROL immobilized in Lifetech™ AP1090M were about 80 % (w/w) for the systems with C8:0 and 78 % (w/w) for the systems with C10:0. In the assays catalyzed by rROL immobilized in Lifetech™ ECR1030M, a new TAG yield of about 50 % (w/w) was achieved for the systems with the C8:0 while for the reactions with the C10:0, production values of about 70 % (w/w) were reached.

Operational stability tests were carried out at 40 °C, during 24 hours, in batch reactor, using successively the same biocatalyst. Thus, the highest stability values were obtained for the argan oil and C10:0 systems, with half-life times of 84 hours for the rROL immobilized in Lifetech™ AP1090M and 81 hours for the rROL immobilized in Lifetech™ ECR1030M.

Keywords: Low calorie triacylglycerols, Acidolysis, Argan oil, Grapeseed oil, Lipase from *Rhizopus oryzae*.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Objetivos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Propriedades físico-químicas e funcionais dos lípidos	5
2.2. Lípidos Estruturados	11
2.2.1. Definição e aspetos gerais	11
2.2.2. Métodos de produção	12
2.2.2.1. Síntese química	12
2.2.2.2. Síntese enzimática	14
2.2.2.2.1. Mecanismo de interesterificação enzimática	16
2.2.2.2.2. Imobilização de lipases	17
2.2.2.2.3. Parâmetros que influenciam a atividade e estabilidade enzimática	19
2.2.2.2.4. Produção de triacilgliceróis dietéticos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Materiais	25
3.1.1. Biocatalisadores	25
3.1.2. Suportes	25
3.1.3. Substratos	26
3.1.4. Reagentes	28

3.1.5.	Equipamentos	29
3.2.	Métodos	30
3.2.1.	Determinação dos produtos de oxidação dos óleos	30
3.2.2.	Ensaio de acidólise enzimática.....	31
3.2.3.	Ensaio de estabilidade operacional	32
3.2.4.	Análise dos produtos de reação	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1.	Caracterização do estado de oxidação dos óleos	42
4.2.	Síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM	42
4.3.	Estabilidade operacional	47
5.	CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	54
5.1.	Conclusões gerais.....	54
5.2.	Sugestões para trabalhos futuros.....	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. – Estrutura representativa de um triacilglicerol	6
Figura 2. – Estrutura representativa de um ácido gordo	6
Figura 3. – Representação estrutural de um ácido gordo saturado e de um ácido gordo insaturado	8
Figura 4. – Estrutura dos principais ácidos gordos insaturados	9
Figura 5. – Formas cristalinas dos TAG.....	10
Figura 6. – Métodos de produção de lípidos estruturados (adaptado de Hamam, 201.....	12
Figura 7. – Representação esquemática da reação de acidólise enzimática, entre um TAG e um ácido gordo livre de cadeia média (MCFA)	17
Figura 8. – Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm ³) sob agitação magnética. ...	31
Figura 9. – Cromatogramas referentes à amostra às 0 h (A) e após 24 h (B), da reação de acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de graminha de uva e o ácido cáprico, catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech TM AP1090M.....	35
Figura 10. – Curvas de calibração para o ácido caprílico (C8:0) e para o ácido cáprico (C10:0)	36
Figura 11. – Curva de calibração para a trilinoína.....	37
Figura 12. – Representação esquemática da deposição de amostra numa placa de TLC ...	38
Figura 13. – Desenvolvimento de placas de TLC numa tina cromatográfica de vidro	39
Figura 14. – Exemplo de uma placa de TLC de sílica gel revelada com diclorofluoresceína, sendo visíveis os diferentes grupos de compostos	39
Figura 15. – Cinética de acidólise: Consumo de ácido caprílico ou ácido caprílico e de TAG iniciais e produção de TAG novos na reação de acidólise entre o óleo de argão ou óleo de graminha de uva e o ácido caprílico ou ácido caprílico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech TM AP1090M	44

Figura 16. – Cinética de acidólise: Consumo de ácido caprílico ou ácido capríco e de TAG iniciais e produção de TAG novos na reação de acidólise entre o óleo de argão ou óleo de gralha de uva e o ácido caprílico ou ácido capríco, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M45

Figura 17. – Atividade residual da rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M ao fim de 3 reutilizações de 24 h a 40 °C na acidólise de óleo de argão com C8:0 (Arg-C8), óleo de gralha de uva com C8:0 (Uva-C8), óleo de argão com C10:0 (Arg-C10) e óleo de gralha de uva com C10:0 (Uva-C10)48

Figura 18. – Atividade residual da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M ao fim de 4 reutilizações de 24 h a 40 °C na acidólise de óleo de argão com C8:0 (Arg-C8), óleo de gralha de uva com C8:0 (Uva-C8), óleo de argão com C10:0 (Arg-C10) e óleo de gralha de uva com C10:0 (Uva-C10)49

Figura 19. – Incorporação molar (%) do C8:0 ou C10:0 nos novos TAG em presença de rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M ao longo de 3 reutilizações de 24 h a 40 °C52

Figura 20. – Incorporação molar (%) do C8:0 ou C10:0 nos novos TAG em presença de rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M ao longo de 3 reutilizações de 24 h a 40 °C.....53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. – Composição em ácidos gordos (%) do óleo de argão e do óleo de graminha de uva	27
Tabela 2. – Valores referentes às absorvâncias dos produtos de oxidação primários e secundários para cada óleo testado	42
Tabela 3. – Modelos de inativação enzimática para <i>r</i> ROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e <i>r</i> ROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M nas reações de acidólise entre o óleo de argão ou o óleo de graminha de uva e o ácido caprílico ou ácido cáprico, respetivos coeficientes de determinação e tempos de meia vida	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG – Ácidos gordos

AGL – Ácidos gordos livres

ALA – *Alfa-linolenic acid* – Ácido alfa-linolénico

ARA – *Arachidonic acid* – Ácido araquidónico

a_w – Atividade da água

DAG - Diacilgliceróis

DHA – *Docosahexaenoic acid* – Ácido docosa-hexenóico

EFA – *Essential fatty acids* – Ácidos gordos essenciais

EPA – *Eicosapentaenoic acid* – Ácido eicosa-pentenóico

L – Ácido gordo de cadeia longa

LLL - *Long Long Long* – Triacilgliceróis contendo ácidos gordos de cadeia longa

LCFA – *Long chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia longa

M – Ácido gordo de cadeia média

MAG – Monoacilgliceróis

MLM – *Medium Long Medium* – Triacilgliceróis contendo um ácido gordo de cadeia média nas posições *sn*-1,3 e um ácido gordo de cadeia longa na posição interna

MCFA – *Medium chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia média

MUFA – *Monounsaturated fatty acids* – Ácidos gordos monoinsaturados

PUFA – *Polyunsaturated fatty acids* – Ácidos gordos polinsaturados

rROL – Lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*

SCFA – *Short chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia curta

SFA – *Saturated fatty acids* – Ácidos gordos saturados

SL – *Structured lipids* – Lípidos estruturados

TAG – Triacilgliceróis

t_{1/2} – Tempo de meia vida

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Enquadramento do tema

Nas últimas décadas, as sociedades, sobretudo nos países desenvolvidos, tornaram-se menos rurais e mais urbanas, o que impulsionou o crescimento da indústria, melhorando assim a qualidade de vida das populações. No entanto, a escolha de alimentos menos saudáveis associado à inatividade física, tornaram mais difícil manter uma dieta equilibrada e consequentemente compensar o consumo com o gasto de energia. Isto levou ao aumento da obesidade e outros problemas de saúde, tais como, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial (Howlett, 2008).

Como consequência dessas doenças, o setor alimentar tem vindo a deparar-se com consumidores cada vez mais conscientes, interessados e informados em relação ao que consomem, revelando um crescente interesse por alimentos mais saudáveis. Assim, a indústria alimentar tem procurado evoluir no fabrico de produtos de qualidade, naturais e saudáveis, o que conduziu ao desenvolvimento dos alimentos funcionais.

Os alimentos funcionais começaram a ser desenvolvidos no Japão, durante a década de 80, através de um programa do governo que tinha como objetivo a criação de produtos alimentares com características específicas, capazes de influenciar inúmeras funções do organismo, para além de reunir as necessidades nutricionais básicas (Howlett, 2008).

Assim, os alimentos funcionais podem ser definidos como todos aqueles que, quando consumidos na alimentação diária, podem trazer benefícios adicionais para a saúde e bem-estar geral, para além de satisfazerem os requerimentos nutricionais básicos (Howlett, 2008). Estes alimentos contêm determinados componentes fisiologicamente ativos que lhes conferem a capacidade de regular diversas funções corporais, de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, cancro e osteoporose (Souza *et al.*, 2003). São alimentos aos quais foram adicionados ou removidos componentes, por métodos tecnológicos ou biotecnológicos, de modo a proporcionar efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde. Podem ainda ser alimentos em que a natureza e/ou a biodisponibilidade de um ou mais constituintes foram modificadas. Um alimento pode ser funcional para a população em geral ou para grupos com necessidades específicas (Howlett, 2008).

Os lípidos são compostos essenciais para o organismo humano pois, para além de serem uma excelente fonte de energia, são veículos de vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e ácido linolénico) (Ribeiro e Seravalli, 2007).

O óleo de argão e o óleo de gralha de uva constituem uma excelente fonte de ácidos gordos insaturados e essenciais. Ambos são ricos em ácido linoleico e ácido oleico mas também em ácido palmítico e ácido esteárico (Rueda *et al.*, 2014). No entanto, o ácido gordo maioritário do óleo de gralha de uva é o ácido linoleico, enquanto que no óleo de argão é o ácido oleico que está presente em maior quantidade.

Assim, estes óleos, tornam-se bastante interessantes sob o ponto de vista nutricional e dietéticos, pelo que as suas potencialidades merecem ser exploradas pela indústria alimentar, que ao longo dos últimos anos tem procurado desenvolver óleos e gorduras mais saudáveis e naturais, tendo em conta as necessidades e exigências dos consumidores.

Neste âmbito, surgiu uma nova geração de óleos e gorduras “feitos sob medida” (*Tailor-made Fats*), designados de lípidos estruturados (*Structured Lipids*, SL). O interesse pela produção deste tipo de lípidos surge pela capacidade de combinar as características benéficas de diferentes ácidos gordos numa única molécula de triacilglicerol (Akoh, 1998).

Os lípidos estruturados são definidos como triacilgliceróis (TAG), cujas características físicas e/ou químicas foram modificadas, por via química ou por via enzimática, pela incorporação de novos ácidos gordos ou pela alteração da posição dos ácidos gordos, em relação ao seu estado original (Akoh e Lee, 1998).

O modo de produção dos SL pode variar consoante o tipo de substrato disponível, no entanto os métodos mais utilizados são: esterificação, acidólise, alcoólise, ou interesterificação (Hamam, 2013).

Os triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM (*Medium–Long–Medium*) são um exemplo de lípidos estruturados obtidos por modificação da sua composição em ácidos gordos. Estes SL são constituídos por ácidos gordos de cadeia média (M), nas posições externas (*sn*–1 e *sn*–3) e por ácidos gordos de cadeia longa (L), na posição interna (*sn*–2) do esqueleto de glicerol.

Os MLM apresentam interesse dietético devido ao seu baixo valor calórico (cerca de 5 kcal/g), ao contrário dos óleos e gorduras convencionais (cerca de 9 kcal/g). Como tal, estes

produtos lipídicos são úteis no controlo da obesidade e indicados para indivíduos com má absorção de gordura e problemas de metabolismo (Xu, 2000).

A produção de TAG dietéticos do tipo MLM pode ser feita através de catálise enzimática. Esta apresenta múltiplas vantagens face ao método convencional químico, especialmente devido às características de regio e estereo-seletividade e especificidade das lipases. Além disso, as reações catalisadas por lipases realizam-se sob condições mais suaves de pressão e temperatura, o que se traduz na redução de efeitos poluentes e de custos associados ao processo. Por estas razões, ao longo das últimas décadas, a procura de lipases capazes de catalisar reações destinadas à produção de lípidos estruturados com propriedades funcionais específicas aumentou significativamente, tendo vindo a substituir progressivamente os catalisadores inorgânicos (Xu, 2000).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que hidrolisam ésteres em meio aquoso. Em meios não aquosos com baixa atividade de água, as lipases são também capazes de catalisar diferentes reações, nomeadamente reações de esterificação e interesterificação (Cambou e Klivanov, 1984; Zaks e Klivanov, 1985).

Graças a todas as características benéficas, os lípidos estruturados, também conhecidos como *Tailor-made Fats*, têm vindo a crescer gradativamente na indústria alimentar, trazendo novos desafios ao mercado, além de levantarem questões sobre a forma como o organismo humano reage a estes produtos (Akoh *et al.*, 1998), pelo que a comunidade científica deve investigar melhor esta área.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consistiu na produção de lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM, a partir de óleo de argão e óleo de graminha de uva, utilizando lipases não comerciais *sn*-1,3 seletivas. Neste caso, pretendeu-se produzir TAG ricos em ácido oleico ou ácido linoleico em posição *sn*-2 e em ácidos gordos de cadeia média C8:0 ou C10:0, nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do esqueleto de glicerol.

Assim, realizaram-se ensaios de interesterificação por acidólise enzimática entre os ácidos gordos livres (AGL) do óleo de argão ou do óleo de graminha de uva e o ácido caprílico (C8:0) ou o ácido cáprico (C10:0). Os ensaios foram catalisados pela lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL), imobilizada em dois suportes diferentes: Lifetech™ AP1090M e Lifetech™ ECR1030M. As reações ocorreram em reatores descontínuos, em meio livre de solvente e à pressão atmosférica, com o intuito de implementar um sistema reacional economicamente competitivo e de baixo impacto ambiental. Todos os ensaios decorreram durante 24 horas, utilizando uma razão molar TAG:AGL de 1:2 e uma carga de enzima de 5 % em relação à massa de óleo. Foram realizados ensaios a temperaturas diferentes (30, 40 e 50 °C), de forma a escolher a temperatura mais adequada à produção de novos TAG.

Do ponto de vista de implementação industrial, as enzimas têm de apresentar uma elevada atividade catalítica e devem mantê-la durante o maior período de tempo possível. Neste sentido, avaliou-se também a estabilidade operacional da rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, recorrendo a ensaios com reutilizações sucessivas, para determinar os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) dos biocatalisadores utilizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Propriedades físico-químicas e funcionais dos lípidos

Os lípidos pertencem a um grupo muito extenso e heterogêneo de substâncias orgânicas, não sendo fácil defini-los de forma exata. Em geral, são macromoléculas compostas por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O), tendo como denominador comum o facto de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como o éter, o clorofórmio e o hexano (Campos, 1998). Os lípidos são os maiores componentes do tecido adiposo e, juntamente com os glúcidos e as proteínas, constituem o grupo de compostos mais frequente em alimentos (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Os alimentos ricos em lípidos são muitas vezes considerados como alimentos menos saudáveis e com efeitos nefastos para a saúde, pois o seu consumo excessivo pode provocar problemas de obesidade devido ao seu elevado valor calórico. Além disso, dietas ricas em gorduras podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro. Contudo, tem sido verificado que o consumo de determinados óleos e gorduras causam efeitos positivos na saúde, devido a conterem compostos essenciais para o crescimento, manutenção da saúde e prevenção de doenças, em crianças e adultos (Willis e Marangoni, 1999). Assim, os lípidos desempenham um papel fundamental nos produtos alimentares, uma vez que, exercem funções a nível estrutural, nutricional e sensorial (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Em termos estruturais, estas biomoléculas são responsáveis pelo isolamento térmico e permeabilidade das paredes celulares, visto que são um dos principais constituintes estruturais das células (Ribeiro e Seravalli, 2007).

A nível nutricional, os lípidos são importantes para o organismo humano pois, para além de serem uma excelente fonte de energia (fornecem cerca de 9 kcal/g, ou seja, mais elevado que o valor energético dos glúcidos e das proteínas), são veículos de vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e ácido linolénico) (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Sensorialmente, têm a capacidade de melhorar a textura, o flavour e a palatibilidade dos alimentos, bem como a sensação de saciedade após a refeição (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Os lípidos maioritários num óleo ou gordura são os triacilgliceróis (TAG), moléculas hidrófobas que representam cerca de 97 %. Os TAG são obtidos a partir de uma reação de esterificação entre três ácidos gordos e uma molécula de glicerol, com o estabelecimento de ligações do tipo éster (Quintas *et al.*, 2008) (figura 1).

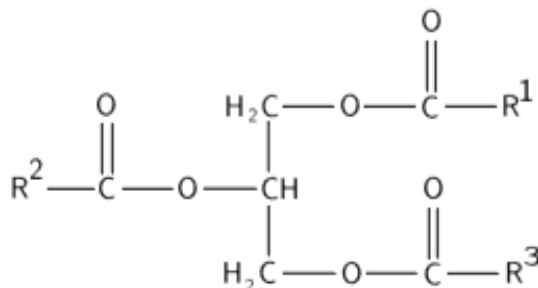


Figura 1. Estrutura representativa de um triacilglicerol

As propriedades fisiológicas, o metabolismo e os benefícios para a saúde de um ácido gordo presente na molécula de glicerol depende do comprimento da cadeia, da posição e do seu grau de insaturação (Osborn e Akoh, 2002).

Os ácidos gordos (AG) são biologicamente importantes para as células, sobretudo por participarem na sua organização estrutural e por serem uma fonte de energia. Estes caracterizam-se por possuírem uma cadeia hidrogenocarbonada alifática linear, não ramificada, saturada ou insaturada, contendo apenas um grupo funcional, o grupo carboxilo (-COOH) (Quintas *et al.*, 2008) (figura 2).

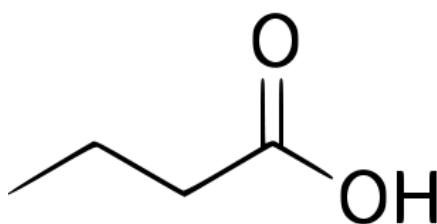


Figura 2. Estrutura representativa de um ácido gordo

A classificação dos ácidos gordos baseia-se de acordo com o comprimento e grau de insaturação da respectiva cadeia de carbono (Berg *et al.*, 2002).

Em relação ao comprimento da cadeia, os ácidos gordos podem ser classificados em: ácidos gordos de cadeia curta, ácidos gordos de cadeia média e ácidos gordos de cadeia longa (Osborn e Akoh, 2002).

Os ácidos gordos de cadeia curta (*Short Chain Fatty Acids*, SCFA) possuem entre 2 e 6 átomos de carbonos e são conhecidos pela sua volatilidade, sendo as suas principais

fontes, a manteiga e o leite de vaca. Estes ácidos gordos são mais facilmente absorvidos pelo estômago e pelo intestino delgado do que outros ácidos gordos, devido ao reduzido comprimento da cadeia carbonada, baixa massa molecular e por serem solúveis em água. Os SCFA são benéficos na redução de peso devido ao seu baixo valor calórico (Osborn e Akoh, 2002).

Os ácidos gordos de cadeia média (*Medium Chain Fatty Acids*, MCFA) têm entre 6 e 12 átomos de carbono e encontram-se maioritariamente no óleo de coco e no óleo de palmiste. Os MCFA são preferencialmente transportados através da veia porta para o fígado, onde são rapidamente metabolizados pelo organismo, pois apresentam maior solubilidade do que os ácidos gordos de cadeia longa. Como estes ácidos gordos não são rapidamente re-esterificados em novos triacilgliceróis, não há tendência da gordura ficar acumulada no tecido adiposo, apresentando assim vantagens no controlo de peso. Contudo, quando consumidos em excesso têm o inconveniente de aumentar os níveis de colesterol no sangue (Osborn e Akoh, 2002).

Os ácidos gordos de cadeia longa (*Long Chain Fatty Acids*, LCFA) possuem entre 14 e 24 átomos de carbono, estando presentes principalmente em gorduras animais, óleos vegetais e óleos de animais marinhos. Estes ácidos gordos são absorvidos e metabolizados mais lentamente do que os SCFA e os MCFA. Dado a sua hidrofobicidade, os LCFA não podem ser absorvidos ou transportados no sangue. Em vez disso, eles formam micelas, de modo a conseguirem entrar nas células intestinais, onde se formam os quilomícrons. Estes são segregados no sistema linfático e, finalmente, entram na circulação sistêmica (Osborn e Akoh, 2002).

Dentro dos LCFA, existem alguns ácidos gordos particularmente importantes para o organismo humano, devido às suas propriedades funcionais e nutricionais – os ácidos gordos essenciais (*Essential Fatty Acids*, EFA). Estes não são sintetizados pelos mamíferos, portanto é necessário ingeri-los através da alimentação (Akoh, 2002). São exemplos deste tipo de ácidos gordos, o ácido linoleico (ómega-6) e o ácido linolénico (ómega-3).

O ácido linoleico (C18:2), encontra-se na maioria dos óleos vegetais e sementes de plantas, podendo dar origem ao ácido araquidónico (*Arachidonic Acid*, ARA – C20:4) (Osborn e Akoh, 2002).

O ácido linolénico (C18:3), está presente sobretudo no óleo de soja e no óleo de linhaça. Dentro dos ácidos gordos polinsaturados ómega-3, são exemplos os ácidos eicosapentenóico (*Eicosapentaenoic Acid*, EPA – C20:5), docosa-hexenóico (*Docosahexaenoic*

Acid, DHA – C22:6) e alfa-linolénico (*Alpha-Linolenic Acid*, ALA – C18:3). Os ácidos gordos ómega-3 são importantes na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e são essenciais no crescimento e desenvolvimento humano (Willis et al., 1998).

Relativamente ao número de insaturações, os ácidos gordos podem ser classificados em ácidos gordos saturados ou ácidos gordos insaturados (figura 3).

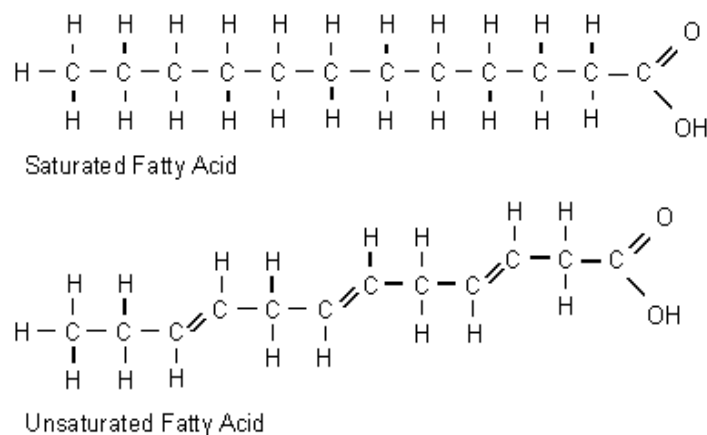


Figura 3. Representação estrutural de um ácido gordo saturado e de um ácido gordo insaturado

Os ácidos gordos saturados (*Saturated Fatty Acids*, SFA) apresentam apenas ligações simples entre os átomos de carbono. Os SFA de maior interesse são o ácido caprílico (C8:0), o ácido cáprico (C10:0), o ácido láurico (C12:0), o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0). Encontram-se principalmente nas gorduras de origem animal, como a manteiga, e em alguns óleos vegetais, como o óleo de coco e o óleo de palma. (Ribeiro e Seravalli, 2007). Em geral, as gorduras ricas em SFA apresentam um ponto de fusão elevado, encontrando-se no estado sólido à temperatura de 20 °C (Nelson e Cox, 2005).

Os ácidos gordos insaturados podem conter uma ou mais ligações duplas, e estão presentes sobretudo nas plantas superiores, em animais marinhos e em animais que vivem a baixas temperaturas (Ribeiro e Seravalli, 2007). Aqueles que apresentam apenas uma ligação dupla são considerados ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids*, MUFA). O MUFA mais comum é o ácido oleico (C18:1) e está presente maioritariamente no azeite e no óleo de girassol. Por outro lado, os que forem compostos por duas ou mais ligações são designados de ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA). Os PUFA de maior interesse são o ácido linoleico (C18:2), o ácido linolénico (C18:3), o araquidónico (ARA – C20:4), o ácido eicosa-

pentenóico (EPA – C20:5), e o ácido docosa-hexenóico (DHA – C22:6), que contêm, respetivamente, 2, 3, 4, 5 e 6 ligações duplas. Estes podem ser encontrados em alguns óleos vegetais e essencialmente em óleos de peixe e de animais marinhos (cetáceos). Geralmente, os PUFA, têm baixos pontos de fusão e são suscetíveis à oxidação, apresentando-se na forma líquida à temperatura de 20 °C, sendo por isso designados de óleos (Nelson e Cox, 2005) (figura 4).

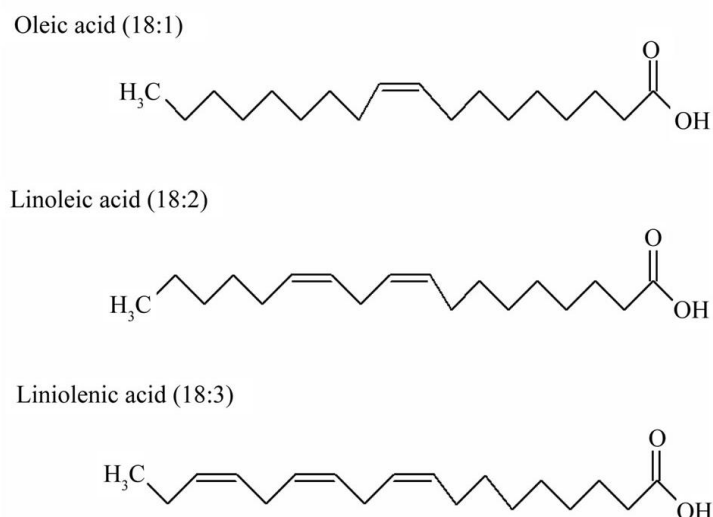


Figura 4. Estrutura dos principais ácidos gordos insaturados

Assim, constata-se que os óleos e as gorduras são conceitos distintos. A diferença entre estes dois termos está na sua forma física. As gorduras encontram-se no estado sólido, enquanto os óleos apresentam-se na forma líquida, à temperatura de 20 °C (Ribeiro e Seravalli, 2007).

O conhecimento das propriedades físicas dos óleos e gorduras constitui um requisito essencial para avaliar e controlar de forma eficaz o processo de produção e as características de determinado produto. Essas propriedades dependem da composição química dos TAG, sendo as mais importantes o ponto de fusão e o polimorfismo.

O ponto de fusão de uma mistura de diferentes TAG pode ser definido como a temperatura à qual ocorre a sua fusão completa. Nos TAG puros, o ponto de fusão está relacionado com o comprimento da cadeia carbonada (quanto maior o comprimento da cadeia, maior o ponto de fusão), com as ramificações (AG com cadeias lineares têm maior ponto de fusão que os AG com ramificações), com o grau de insaturação dos AG constituintes (quanto maior o número de insaturações, menor o ponto de fusão) e com a sua distribuição ao longo da molécula de glicerol (TAG com distribuição mais simétricas têm maior ponto de fusão).

No entanto, as gorduras têm diferentes TAG na sua composição, cada um com o seu ponto de fusão. Por consequência, uma gordura não tem um ponto de fusão definido mas sim uma faixa de temperatura de fusão (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Em relação ao polimorfismo, as misturas de TAG são líquidas à temperatura de fusão, no entanto formam cristais, quando são arrefecidas até à temperatura de solidificação. Os TAG são polimórficos, isto é, podem existir em vários arranjos cristalinos diferentes, cada um com o seu ponto de fusão (Ribeiro e Seravalli, 2007; Hernqvist, 1990). As três formas cristalinas mais comuns são a hexagonal, a ortorrômbica e a triclinica, que são normalmente designadas de α , β' e β , respetivamente (Damodaran e Parkin, 2017; Ribeiro e Seravalli, 2007) (figura 5).

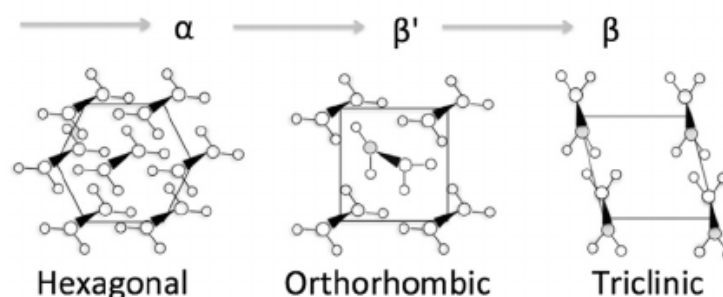


Figura 5. Formas cristalinas dos TAG

A forma α é a mais instável, com menor ponto de fusão e menor densidade. Os cristais α formam-se na fase inicial do processo de cristalização devido ao arrefecimento rápido, podendo ser transformados na forma β ou β' , devido à falta de estabilidade (Marangoni, 2005).

A forma β' é uma forma estável para certos tipos de TAG, visto que apresenta cristais relativamente pequenos que podem incorporar grandes volumes de líquido. Eles conferem ao produto uma superfície brilhante e textura homogênea (Ghotra *et al.*, 2002).

A forma β é a mais estável, com maior ponto de fusão e maior densidade. Esta forma polimórfica apresenta inicialmente cristais pequenos, que crescem formando aglomerados na forma de agulhas e com menor capacidade de incorporar líquidos e produzindo textura arenosa (Ribeiro e Seravalli, 2007).

A aplicabilidade das gorduras e/ou de misturas de gorduras na indústria alimentar depende das suas características de fusão e cristalização (Ribeiro e Seravalli, 2007).

2.2. Lípidos Estruturados

2.2.1. Definição e aspetos gerais

Como referido anteriormente, os lípidos possuem uma grande variedade de propriedades funcionais, nutricionais e organoléticas, que dependem do comprimento da cadeia de carbono, do grau de insaturação dos ácidos gordos constituintes e da sua posição ao longo da molécula de glicerol. Isto levou ao desenvolvimento de novas tecnologias de modificação de óleos e gorduras, de modo a melhorar essas propriedades.

Assim, surge o interesse pela produção de lípidos estruturados (SL), sendo possível combinar as características benéficas de diferentes ácidos gordos numa única molécula de triacilglicerol (Akoh, 1998).

Os SL são definidos como triacilgliceróis que foram reestruturados ou modificados, por via química ou enzimática, pela incorporação de novos ácidos gordos ou pela alteração da posição dos ácidos gordos, em relação ao seu estado original (Akoh e Lee, 1998).

Essas alterações de estrutura, concedem aos SL propriedades nutricionais ou funcionais específicas, que são parcial ou totalmente diferentes daquelas que possuíam no seu estado nativo. Por esta razão, os SL são considerados a nova geração de óleos e gorduras “feitos sob medida”, que vieram satisfazer necessidades específicas dos consumidores (Akoh e Kim, 2015).

Estes lípidos podem ser sintetizados com o objetivo de melhorar ou modificar as características físicas (ponto de fusão, conteúdo de gordura sólida, consistência e viscosidade), químicas (estabilidade oxidativa) ou nutricionais (incorporação de ácidos gordos essenciais e diminuição do valor calórico).

Além de serem usados na área alimentar, os lípidos estruturados são bastante utilizados para fins medicinais e nutracêuticos, para o tratamento e/ou prevenção de doenças (Osborn e Akoh, 2002).

Exemplos de SL são os TAG dietéticos, do tipo MLM, de reduzido valor calórico, os substitutos da gordura de leite materno, os substitutos da manteiga de cacau e TAG enriquecidos em ómega-3 PUFA ou em outros tipos de ácidos gordos (Ferreira-Dias *et al.*, 2013).

2.2.2. Métodos de produção

Os lípidos estruturados podem ser produzidos por via química (inorgânica) ou por via enzimática (orgânica), a partir de triacilgliceróis de cadeia curta, média ou longa, presentes em gorduras de origem vegetal ou animal (Akoh e Lee, 1998; Akoh e Kim, 2015).

De acordo com o tipo de substrato disponível, pode-se recorrer a diferentes métodos de produção, tais como, esterificação, acidólise, alcoólise, ou interesterificação (Hamam, 2013).

As reações de esterificação ocorrem entre um ácido e um álcool, formando um éster e água. A interesterificação é a reação entre dois ésteres diferentes, para gerar novos ésteres. A alcoólise é a reação entre um éster e um álcool. A acidólise é a reação entre um éster e um ácido (Gunstone, 2006) (figura 6).

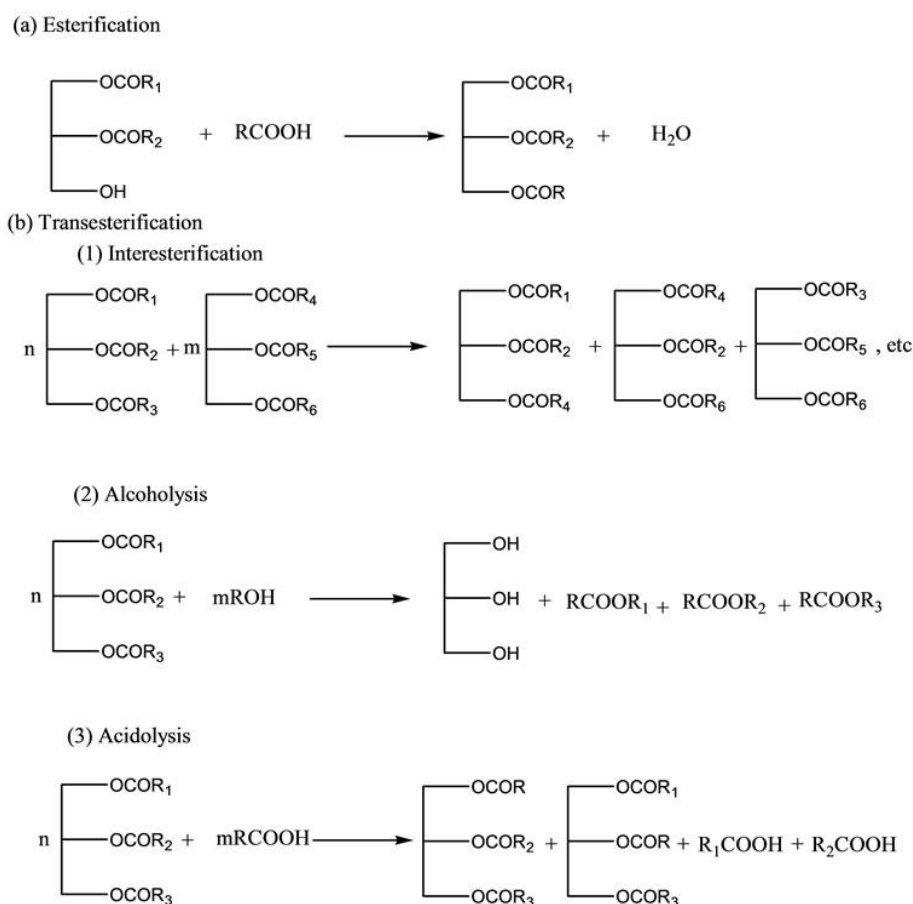


Figura 6. Métodos de produção de lípidos estruturados

Fonte: Hamam (2013)

2.2.2.1. Síntese química

A síntese de lipídios estruturados por via química é o método mais antigo e o mais usado na indústria atualmente (Rousseau *et al.*, 1996).

Este processo ocorre sob a influência de um catalisador químico, que provoca a modificação aleatória da posição dos ácidos gordos dentro da molécula de TAG (Marangoni e Rousseau, 1995).

A síntese química começa a partir do momento em que se adiciona à gordura um catalisador inorgânico (e.g. metóxido de sódio). A reação requer temperaturas elevadas (70 a 150 °C), sob pressão reduzida e condições anidras (Erickson, 1995; Moreno *et al.*, 2004). O catalisador vai promover a libertação dos ácidos gordos das moléculas dos diferentes triacilgliceróis e vai ligar-se aos radicais livres que outros ácidos gordos deixaram, no mesmo ou noutro triacilglicerol constituinte dessa gordura.

As principais vantagens da interesterificação química são: o método de produção é simples, rápido e não exige equipamento muito dispendioso, apesar de requerer um número relativamente elevado de operações unitárias para recuperar e purificar o produto final (Rosseau e Marangoni, 2002).

No entanto, a síntese química apresenta inúmeras desvantagens, como por exemplo, o facto destas reações serem pouco específicas, oferecendo pouco ou nenhum controlo sobre a distribuição posicional de ácidos gordos no produto final, o elevado consumo energético devido às altas temperaturas de reação e às baixas pressões, a degradação dos PUFA, a dificuldade de remoção do catalisador no final da reação, e a consequente possibilidade de contaminação dos produtos finais. Devido à falta de especificidade do catalisador, podem ainda ocorrer reações secundárias indesejadas, originando produtos secundários, como sabões, monoacilgliceróis e diacilgliceróis que necessitam de ser removidos, diminuindo assim o rendimento da reação e aumentando os custos de purificação da gordura interesterificada. Os catalisadores químicos possuem ainda a desvantagem de reagirem com a água, havendo o risco de ocorrência de explosões, mesmo em presença de quantidades de água vestigiais (Erickson, 1995).

Uma das aplicações da síntese química no âmbito dos óleos e gorduras é o melhoramento das propriedades físicas da banha, que tende a formar cristais grosseiros, difíceis de controlar durante o armazenamento. Isto acontece porque 64 % do ácido

palmítico está ligado na posição *sn*-2 da molécula de glicerol. Ao tornar aleatória a distribuição posicional dos ácidos gordos da banha por interesterificação química, as propriedades físicas são melhoradas, e a banha “reorganizada” torna-se suave, com maior plasticidade (DeMan, 1999).

Outra aplicação desta técnica é no fabrico de margarinas e cremes para barrar, para modificar o seu ponto de fusão, de modo a melhorar a textura e aumentar a sua estabilidade (Ghazali et al., 1995; Nawar, 1996). A nível nutricional, a principal vantagem da interesterificação química é a produção de margarinas e outros produtos, sem recurso à hidrogenação, o que vai permitir um produto final livre de ácidos gordos *trans* (Willis et al., 1998).

2.2.2.2. Síntese enzimática

Uma alternativa à síntese de lipídeos estruturados por via química é o processo enzimático, que tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. A modificação e síntese lipídica promovida por lipases apresenta-se bastante promissora e viável, devido às potencialidades das lipases e à sua versatilidade como catalisadores de reações (Hamam, 2013; Xu, 2003).

As lipases (triacylglycerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que pertencem à família das hidrolases e que atuam sobre ésteres insolúveis em água (como triacylgliceróis) nas interfaces óleo-água. O papel destas enzimas é hidrolisar os triacylgliceróis em diacylgliceróis, monoacylgliceróis, ácidos gordos livres e glicerol (Houde et al., 2004). Em meios não aquosos com baixa atividade de água, as lipases são também capazes de catalisar diferentes reações, nomeadamente reações de esterificação e reações de interesterificação entre um éster e um álcool (alcoólise), um éster e um ácido (acidólise) ou entre ésteres (transesterificação) (Cambou e Klibanov, 1984; Zaks e Klibanov, 1985).

Quando comparadas com outras enzimas, as lipases são altamente estáveis, mesmo em condições adversas, como solventes orgânicos e altas temperaturas.

As lipases encontram-se distribuídas na natureza, em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microorganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum*

sp, as leveduras *Tulopsis sp* e *Candida sp* e as bactérias *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp* (Campos, 2010).

Ao contrário dos catalisadores inorgânicos, as lipases apresentam, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, uma elevada seletividade, no que diz respeito à classe dos lípidos: tri-, di- e monoacilgliceróis, ésteres do colesterol, ésteres do retinol, ésteres metílicos dos ácidos gordos, à posição dos ácidos gordos na molécula de glicerol, às características dos ácidos gordos (nomeadamente o comprimento da cadeia carbonada e o grau de saturação/insaturação), a um isómero ótico ou, ainda, a alguma combinação destas situações (Jensen *et al.*, 1992).

As lipases podem ser classificadas em dois grupos distintos, consoante a especificidade da enzima, isto é, a sua preferência posicional para as ligações éster na molécula de TAG. Podem ser lipases não específicas, quando não apresentam especificidade em relação à posição dos ácidos gordos, atuando nas três posições da molécula de glicerol ou lipases com especificidade *sn*-1,3, quando hidrolisam as ligações éster apenas nas posições externas da molécula de TAG, deixando inalterada a posição interna *sn*-2 (Xu, 2000).

O uso de uma lipase *sn*-1,3 específica como catalisador da reação, permite manter os ácidos gordos na posição interna da molécula de TAG, o que é nutricionalmente desejável e não é possível obter através da interesterificação química (Macrae, 1983; Ferreira-Dias, 2010).

A modificação de óleos e gorduras por via enzimática oferece muitas vantagens sobre a via química (Xu, 2003). Geralmente, as reações catalisadas por lipases realizam-se sob condições mais suaves (temperatura inferior a 80 °C e à pressão atmosférica) e com maior seletividade, ao contrário das catalisadas quimicamente que exigem temperaturas elevadas e condições de pressão extremas. A seletividade das lipases permite eliminar reações secundárias indesejáveis e, conseqüentemente, aumentar o rendimento da reação e obter um produto com maior grau de pureza. Além disso, o uso de lipases contribui para a redução do consumo de energia, assim como para a redução da poluição térmica (Ferreira-Dias, 2004).

No entanto, a catálise enzimática não apresenta apenas aspetos positivos pois, se assim fosse, já estaria a ser bastante usada a nível industrial. A principal desvantagem da síntese de SL por via enzimática prende-se com o facto desta ser mais dispendiosa do que os métodos químicos (Hamam, 2013). Outras desvantagens são: taxas de reação lentas,

instabilidade, rápida perda da atividade catalítica, impossibilidade de regeneração, variação na qualidade dos produtos, dificuldade de remoção da enzima (quando livre) dos produtos e, consequente contaminação dos produtos com resíduos de proteína (Mateo *et al.*, 2007).

Contudo, como em qualquer processo enzimático, o uso de lipases é limitado a uma faixa relativamente estreita de temperatura e de valores de pH (quando em ambiente aquoso). Além disso, a reação pode ser inibida por altas concentrações de substratos e/ou produtos, por metais pesados e por certos compostos, como produtos de oxidação dos lípidos, ácidos gordos livres e solventes (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998).

Apesar destas limitações, a versatilidade das lipases torna estes biocatalisadores os mais usados na tecnologia enzimática, apresentando aplicações em inúmeros processos, nomeadamente ao nível da indústria alimentar, de detergentes e farmacêutica (Dutta e Ray, 2009, Villeneuve *et al.*, 2000).

2.2.2.2.1. Mecanismo de interesterificação enzimática

O mecanismo de interesterificação enzimática catalisada por lipases (acidólise, alcoólise ou transesterificação) envolve a combinação da hidrólise de ésteres no TAG seguida de re-esterificação (Xu, 2000). Assim, a otimização das reações de interesterificação resulta do balanço entre as taxas das reações de hidrólise e de esterificação. Esse balanço nem sempre é fácil de alcançar, pois depende do teor de água presente no meio reacional. Um elevado teor de água desloca o equilíbrio químico no sentido da hidrólise, enquanto baixas quantidades de água deslocam a reação no sentido da interesterificação (Ferreira-Dias, 2010).

Embora usando lipases *sn*-1,3 específicas, pode ocorrer a migração de grupos acilo no processo geral de produção de SL, desempenhando um papel importante na deterioração da qualidade da SL, devido à formação de TAG indesejáveis (Kim e Akoh, 2005).

A produção de lípidos estruturados tem sido normalmente realizada por acidólise, tal como será efetuado no presente trabalho. Esta reação será catalisada por lipases *sn*-1,3 específicas e consiste em trocar os ácidos gordos livres pelos ácidos presentes no éster (figura 7).

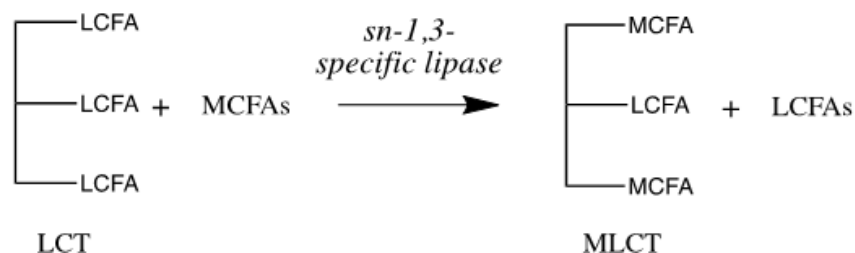


Figura 7. Representação esquemática da reação de acidólise enzimática, entre um TAG e um ácido gordo livre de cadeia média (MCFA)

A acidólise enzimática é uma reação reversível e compreende normalmente duas etapas: hidrólise e esterificação. Os ácidos gordos livres são incorporados nos triacilgliceróis do sistema, até o equilíbrio ser alcançado. Este equilíbrio está relacionado com vários parâmetros, nomeadamente a temperatura de reação, a carga da lipase, o suporte de imobilização da enzima, a atividade da água e o sistema reacional (Sellapan e Akoh, 2001; Yang, 2003; Srivastava *et al.*, 2006; Kim e Akoh, 2006).

O interesse por tecnologias enzimáticas tem aumentado gradativamente, sendo particularmente importantes para produção de produtos de elevado valor acrescentado, como por exemplo TAG dietéticos do tipo MLM, cuja síntese será estudada no presente trabalho.

2.2.2.2. Imobilização de lipases

De modo a diminuir os custos de produção e tornar o processo enzimático mais viável a nível industrial, recorre-se à imobilização das lipases. Esta técnica consiste na fixação das enzimas a um suporte adequado, para que possam ser utilizadas em reatores contínuos ou em reatores descontínuos.

Os sistemas enzimáticos imobilizados apresentam diversas vantagens em relação aos sistemas enzimáticos livres. A imobilização permite a reutilização das lipases em ensaios sucessivos e a sua utilização em reatores contínuos, o que leva a uma redução dos custos do biocatalisador e do tratamento de efluentes, contribuindo assim para o aumento da viabilidade económica dos processos enzimáticos (Knežević *et al.*, 2004). O que torna estes processos bastante mais vantajosos, uma vez que o preço de mercado das lipases é ainda muito elevado, em comparação com o preço dos catalisadores inorgânicos (Ferreira-Dias, 2004).

Além disso, a imobilização permite separar mais facilmente a enzima dos produtos, simplificando assim a recuperação do biocatalisador do meio reacional, o que diminui a possibilidade de contaminação dos produtos com enzima residual (Akoh, 2002). A técnica de imobilização melhora ainda a estabilidade térmica e química das enzimas, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto (Khmelnitsky *et al.*, 1988).

A escolha correta do suporte de imobilização permite criar as condições adequadas no microambiente da enzima para promover a reação, nomeadamente, concentrações de substratos elevadas, mas não inibitórias, baixa concentração de produtos, baixa atividade de água, de modo a favorecer reações de síntese e proteção do biocatalisador contra os efeitos de toxicidade de solventes orgânicos e outras moléculas (Ferreira-Dias, 2004).

No entanto, alcançar um sistema de lipase imobilizada eficiente é bastante difícil, visto que não existe um método geral de imobilização nem um suporte universal. Os critérios de seleção do suporte e da técnica de imobilização dependem do tipo de lipase, do tipo de sistema de reação (meio aquoso, solvente orgânico ou sistema bifásico aquoso/orgânico), das condições do processo (pH, temperatura e pressão), do objetivo de imobilização e do tipo de biorreator (reator descontínuo de mistura completa, reator contínuo do tipo tanque agitado, reator com membrana, reator tubular, etc.) (Knežević *et al.*, 2004).

Existem diversos suportes com características bastante diferentes, tais como área superficial, porosidade, tamanho das partículas, compressibilidade, resistência ao atrito, hidrofobicidade e custo. Alguns exemplos são: carvão ativado, polietileno ativado, alginato de cálcio, celulose, sílica, resinas sintéticas, entre outros. Para a produção de lípidos estruturados, todos os suportes têm que ser inertes e adequados para uso alimentar.

Relativamente às técnicas de imobilização estas encontram-se englobadas em duas categorias: imobilização por ligação a suportes sólidos (por adsorção, ligação covalente ou ligação iónica) ou imobilização por inclusão (ou confinamento) em matrizes, cápsulas ou microcápsulas. Também é possível a combinação de duas ou mais técnicas (Knežević *et al.*, 2004). Tal como referido anteriormente, todos os materiais e metodologias utilizados na imobilização devem ser adequados para a preparação de enzimas imobilizadas com qualidade alimentar.

Contudo, apesar da imobilização aumentar a estabilidade operacional da enzima, a atividade residual da enzima imobilizada é, quase sempre, mais fraca que a da respetiva enzima no seu estado original. Tal deve-se a perdas de atividade e fenómenos de transferência de massa ocorridas durante o processo de imobilização. Isto significa que nem

toda a enzima que é colocada em contacto com o suporte fica imobilizada e, da enzima que se liga ao suporte, parte pode sofrer mudanças na sua conformação, o que poderá alterar a sua eficiência catalítica (Mateo *et al.*, 2007).

De modo geral, a imobilização das lipases em suportes sólidos pode ser vantajosa, visto que aumenta a área interfacial de contacto enzima-substrato. Porém, durante a imobilização, pode haver a possibilidade de inativação da lipase e o risco de se atingirem concentrações inibitórias de substratos e/ou produtos no microambiente (Mateo *et al.*, 2007).

2.2.2.2.3. Parâmetros que influenciam a atividade e estabilidade enzimática

O estudo dos vários parâmetros que influenciam a atividade e a estabilidade das enzimas é fundamental para tornar o processo enzimático mais competitivo.

A estabilidade enzimática é definida como a capacidade que as enzimas têm de reter a sua atividade catalítica ao longo do tempo de reação, sob diferentes condições. Já a atividade enzimática é dada pela medição da velocidade inicial da reação, sob determinadas condições (Campos, 1998).

Muitas enzimas perdem a sua atividade no decorrer da reação, a qual é considerada um processo gradual e natural (Rosevear *et al.*, 1987). A velocidade de perda desta atividade é determinada pelo tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que é definido como o tempo necessário para que a atividade da enzima seja reduzida a metade do seu valor inicial (Campos, 1998).

A atividade e a estabilidade das lipases são influenciadas por diversos fatores, destacando-se a temperatura, o pH (quando em meio aquoso), a atividade da água (a_w), a pressão, a agitação, a composição do meio reacional (concentração do substrato, razão molar entre substratos, etc.), a presença de solventes orgânicos, de agentes oxidantes e de compostos inibidores da atividade enzimática (e.g. produtos de oxidação lipídica, ácidos gordos livres, pigmentos e iões metálicos) (Wisdom *et al.*, 1987; Linfield, 1988; Posorske *et al.*, 1988; Wang e Gordon, 1991).

De seguida encontram-se descritos alguns dos principais parâmetros que afetam a atividade e estabilidade operacional das lipases.

Temperatura

A temperatura é o parâmetro que mais influencia a atividade catalítica das enzimas e deve ser levado em consideração sempre que se pretende aumentar a velocidade da reação. Isto porque, na maior parte dos casos, existe uma relação de proporcionalidade direta entre a temperatura e a velocidade das reações. Ou seja, a atividade catalítica das enzimas é promovida pelo aumento da temperatura. No entanto, valores de temperatura muito elevados podem provocar a inativação das enzimas, de forma reversível ou irreversível (Martinek *et al.*, 1981; Ahern e Klibanov, 1985).

À medida que a temperatura aumenta, observa-se um efeito conjugado do aumento da velocidade da reação e do decréscimo da estabilidade proteica (Malcata *et al.*, 1990). A atividade da enzima para uma vasta gama de temperaturas é, então, determinada pela conjugação destes dois efeitos.

A velocidade da reação é máxima quando se atinge a temperatura ótima. Esta é uma característica própria de cada enzima e geralmente situa-se próximo da temperatura normal das células do organismo onde a enzima atua (Campos, 1998).

O aumento da temperatura, para valores superiores à ótima, provoca o decréscimo da velocidade de reação (Campos, 1998). Em valores extremos de temperatura, pode ocorrer a desnaturação completa e irreversível das enzimas, isto é, a perda da conformação original cataliticamente competente (Martinek *et al.*, 1981; Ahern e Klibanov, 1985).

A desnaturação da enzima dá-se com o aumento da temperatura, que leva ao aumento da energia dos átomos, fazendo com que estes se movimentem, e por sua vez, quebrem as fracas ligações que mantêm a estrutura proteica.

A maioria das enzimas sofre desnaturação a partir dos 40/50 °C, intensificando-se nos 55 °C. Porém, existem enzimas termorresistentes que só desnaturam a temperaturas mais elevadas (Bailley e Ollis, 1986). Como exemplo tem-se as preparações comerciais das lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme RM IM") e de *Candida antarctica* ("Novozym 435"). A elevada atividade e estabilidade térmicas destas enzimas, torna-as mais adequadas para a modificação de gorduras na ausência de solventes orgânicos (Osório *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2014).

A inativação térmica é um aspeto importante a ter em conta na utilização a longo prazo de lipases num biorreator. A viabilidade económica do processo industrial de

interesterificação enzimática depende do período de vida útil do biocatalisador e este, por sua vez, está dependente da temperatura de reação e da resistência da enzima à termoinativação (Bailey e Ollis, 1986).

Assim, sugere-se que a temperatura de funcionamento de um reator contínuo, onde decorra a reação de interesterificação catalisada por lipases imobilizadas, seja aumentada a uma taxa que compense a diminuição da atividade enzimática, de modo a permitir que o sistema mantenha uma atividade catalítica aproximadamente constante (Malcata *et al.*, 1990).

Embora utilizando lipases *sn*-1,3 específicas, pode ocorrer a migração de grupos acilo no processo global de produção de lípidos estruturados, com consequente formação de TAG indesejáveis, o que exerce um papel importante na deterioração dos SL (Kim e Akoh, 2005). Normalmente, quanto menor a temperatura de reação, menor a extensão das migrações de grupos acilo, o que contribui para a formação de SL desejados (Vikbjerg *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 1998)

Produtos de oxidação dos lípidos

Os lípidos estão sujeitos a reações de oxidação, induzidas pela presença de oxigênio, durante o seu acondicionamento e manuseamento à temperatura ambiente.

Algumas gorduras são mais suscetíveis à oxidação que outras, consoante o grau de insaturação (quanto mais insaturada for a gordura, maior a sua suscetibilidade à oxidação), a presença de antioxidantes, a presença de pró-oxidantes, como os metais e outros fatores, como a exposição à luz e ao calor.

O oxigênio reage com os ácidos gordos insaturados, ao nível das suas duplas ligações, que funcionam como o centro ativo pelo qual se inicia a reação de oxidação. Como consequência, há formação de hidroperóxidos (produtos de oxidação primária), os quais podem dar origem a produtos de oxidação secundária, como aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos gordos de cadeia curta. Estes compostos são responsáveis pelo desenvolvimento de “*off-flavours*”, como os identificados como ranço, e outros cheiros que levam à rejeição dos produtos por parte do consumidor (Frankel, 1995).

A presença de produtos de oxidação, principalmente de hidroperóxidos, provoca uma diminuição da atividade e da estabilidade das lipases (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998).

A utilização de gorduras polinsaturadas, que são mais suscetíveis à oxidação, pode conduzir a um decréscimo da atividade e estabilidade operacional das lipases quando utilizadas em reatores contínuos, originando um menor rendimento no produto final (Osório *et al.*, 2006).

O principal desafio na incorporação de TAG enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados em produtos alimentares é manter a sua estabilidade oxidativa, de modo a evitar o desenvolvimento de “*off-flavours*” durante a sua produção e armazenamento (Ferreira-Dias, 2010).

De forma a evitar ou retardar a oxidação de produtos lípidicos, recorre-se a algumas técnicas, tais como, remoção do oxigénio, utilização de um gás inerte no espaço de cabeça dos depósitos, adição de antioxidantes ou uso combinado de alguns destes métodos. Outro aspeto que se deve controlar é a temperatura durante o processamento e armazenamento, pois temperaturas elevadas favorecem a oxidação.

Ácidos gordos livres

Os ácidos gordos livres provêm da hidrólise dos óleos e gorduras, tanto por via química como por via enzimática. Esta reação conduz também ao aparecimento de glicerol e de acilgliceróis parciais (MAG e DAG), em quantidades variáveis consoante a hidrólise seja parcial ou completa. A formação de AGL leva imediatamente a uma alteração das características organoléticas do produto.

A reação de hidrólise prossegue, desde que exista água no meio reacional. À medida que o número de ácidos gordos livres aumenta, o pH do meio diminui. Cada enzima possui um pH ótimo ou uma faixa de pH ótimo de atividade, onde a sua atividade é máxima, sendo que para a maioria das enzimas localiza-se entre 4,5 e 8,0. Grandes mudanças de pH podem provocar alterações no estado de ionização dos resíduos de aminoácidos da enzima que são essenciais à catálise, alterando-se a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas, o que se traduz na perda completa da atividade das enzimas (Campos, 1998).

A presença de elevados teores de ácidos gordos livres pode estar na origem da inativação/inibição das lipases (Tecalão *et al.*, 2012; Casas-Godoy *et al.*, 2013). Nas reações de acidólise, este aspeto limita a utilização de substratos com elevadas concentrações de ácidos gordos livres. Assim, o efeito inibitório conferido pelos ácidos gordos livres é uma das razões que tem limitado a aplicação prática das lipases em alguns sistemas (Dünhaupt *et al.*, 1992). Contudo, existem estudos que demonstram que os teores de ácidos gordos livres existentes nos meios reacionais, sujeitos a interesterificação, parecem não ter qualquer efeito negativo na estabilidade da enzima (Holm e Cowan, 2008).

2.2.2.2.4. Produção de triacilgliceróis dietéticos

Os lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM foram desenvolvidos devido à crescente procura dos consumidores por produtos alimentares mais saudáveis.

A produção de triacilgliceróis constituídos por ácidos gordos de cadeia média (M) nas posições externas (*sn*-1 e *sn*-3), e ácidos gordos de cadeia longa (L) na posição interna (*sn*-2), aumentou de forma acentuada devido às suas propriedades nutricionais únicas (Babayan, 1987; Low *et al.*, 2007; Norlelawati *et al.*, 2010).

Estes SL apresentam interesse dietético pelo seu menor valor calórico (cerca de 5 kcal/g) comparativamente aos óleos e gorduras convencionais (9 kcal/g) (Xu, 2000).

Como tal, estes produtos lipídicos apresentam benefícios claros no controlo da obesidade, sendo também indicados para pessoas com má adsorção de gordura e problemas de metabolismo (Nunes *et al.*, 2011). Isto porque os ácidos gordos de cadeia média nas posições *sn*-1 e *sn*-3 são facilmente hidrolisados pela lipase pancreática, absorvida nos intestinos e rapidamente levada para o fígado, onde são metabolizados como uma fonte de energia rápida e têm pouca tendência para se acumularem nos tecidos adiposos (Osborn e Akoh, 2002; Lee e Lee, 2006).

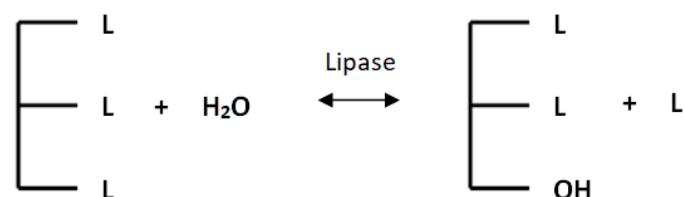
Assim, o consumo deste tipo de lípidos fornece ácidos gordos essenciais de cadeia longa e permite, simultaneamente, a libertação mais lenta e controlada de ácidos gordos de cadeia média na corrente sanguínea (Babayan, 1987).

A síntese de TAG do tipo MLM ocorre geralmente por acidólise, catalisada por lipases *sn*-1,3 específicas, entre um TAG constituído por três ácidos gordos de cadeia longa, do

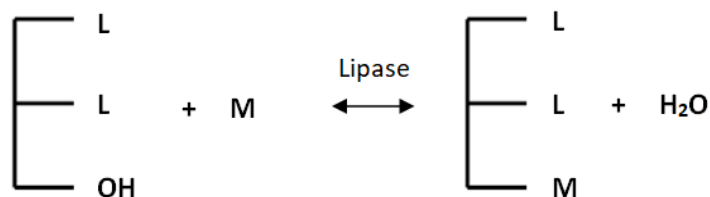
tipo LLL (Long–Long–Long), e ácidos gordos de cadeia média. Esta reação envolve duas fases: uma primeira fase de hidrólise dos TAG seguida de uma fase de esterificação dos diacilgliceróis (DAG) formados com os AGL (Xu, 2003).

Durante o tempo de permanência no reator, a reação referida vai progredindo da seguinte forma:

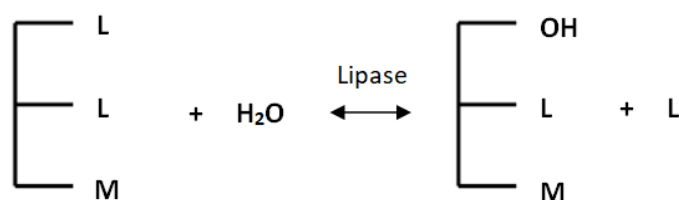
Numa primeira etapa, os TAG do tipo LLL são hidrolisados originando DAG (LL–OH) e AGL de cadeia longa (L).



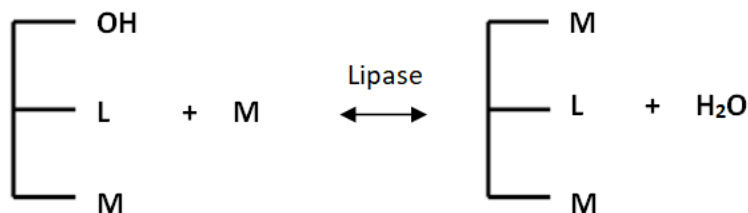
De seguida ocorre a reação de esterificação entre os DAG (LL–OH) e os AGL de cadeia média (M), resultando TAG mono-substituídos (LLM).



Estes sofrem hidrólise originando DAG (OH–LM) e AGL de cadeia longa (L).



Por fim, dá-se a esterificação dos DAG (OH–LM) com os AGL de cadeia média (M) e formam-se os TAG do tipo MLM.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Biocatalisadores

O biocatalisador utilizado foi uma lipase não comercial, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL), produzida por cultivo em fed-batch da levedura metilotrófica da estirpe *Pichia pastoris*. Esta lipase foi produzida conforme o procedimento descrito por Arnau *et al.* (2010), pelo grupo do Professor Francisco Valero, da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha.

Posteriormente, a enzima foi imobilizada em dois suportes distintos: Lifetech™ AP1090M e Lifetech™ ECR1030M, gentilmente doados pela Purolite (Lifetech™, País de Gales, Reino Unido).

3.1.2. Suportes

Lifetech™ AP1090M

O suporte Lifetech™ AP1090M é um polímero de estireno, macroporoso e apresenta-se sob a forma de pequenos grânulos esféricos brancos a ligeiramente amarelados. As principais propriedades físicas e químicas desta resina são a dimensão média dos grânulos entre 0,30 e 0,71 mm e o diâmetro médio dos poros entre 900 e 1100 Å. Devido ao facto deste polímero apresentar poros com diâmetro elevado, o que se traduz numa área superficial maior, a transferência de massa é facilitada. Este suporte pode permanecer armazenado durante um período máximo de 1 ano (<http://www.purolite.com/ls-leaf/immobilized-lipase>).

Lifetech™ ECR1030M

O suporte Lifetech™ ECR1030M é um polímero reticulado de divinilbenzeno (DVB) formado por ésteres metacrílicos, que se apresenta na forma de pequenos grânulos esféricos de cor branca. É uma resina com excelente estabilidade física, sendo bastante utilizada na imobilização de enzimas por adsorção, especialmente na imobilização de lipases. As principais propriedades físicas e químicas deste suporte são a dimensão média dos grânulos entre 0,30 e 0,71 mm, o diâmetro médio dos poros entre 220 e 340 Å e a capacidade de retenção de água entre 57 e 68 %. Esta resina permanece estável em toda a gama de pH e apresenta uma longa duração, podendo permanecer armazenada durante um período máximo de 5 anos, a temperaturas que podem variar entre os 2 °C e os 20 °C (<http://www.purolite.com/ls-product?normalizedName=ecr1030m>).

3.1.3. Substratos

Como fonte de triacilgliceróis utilizou-se o óleo de argão virgem extra, da Clearspring, Londres, Reino Unido, como fonte de ácido oleico e linoleico e o óleo de grinha de uva refinado, da Smile Noël, Pont-Saint-Esprit, França, como fonte de ácido linoleico. Ambos foram adquiridos numa loja de produtos naturais.

Na tabela 1 encontra-se descrita a composição em ácidos gordos do óleo de argão e do óleo de grinha de uva, expressa em percentagem mássica, determinada por cromatografia gasosa capilar.

Tabela 1. Composição em ácidos gordos (%) do óleo de argão e do óleo de grinha de uvaFonte: Rueda *et al.* (2014)

Ácido Gordo	% Mássica	
	Óleo de Argão	Óleo de Grinha de Uva
C14:0	0,12	0,05
C16:0	12,7	7,66
C16:1	0,08	0,03
C17:0	0,02	0,11
C18:0	5,83	4,53
C18:1	45,59	17,65
C18:2	34,6	69,3
C18:3	0,35	0,33
C20:0	0,40	0,16
C20:1	0,17	0,02
C22:0	0,05	0,04
C24:0	0,07	0,13

Os ácidos gordos presentes em maior quantidade no óleo de argão são o ácido oleico (C18:1) com 45,59 %, seguido do ácido linoleico (C18:2) com 34,6 %, do ácido palmítico (C16:0) com 12,7 % e do ácido esteárico (C18:0) presente em 5,83 %.

O óleo de grinha de uva é constituído maioritariamente pelo ácido linoleico (C18:2) com 69,3 %, seguido do ácido oleico (C18:1) com 17,65 %, do ácido palmítico (C16:0) com 7,66 % e do ácido esteárico (C18:0) presente em 4,53 %.

Os restantes ácidos, mirístico (C14:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanóico (C17:0), alfa-linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), gadoleico (C20:1), beénico (C22:0) e lignocérico (C24:0), estão presentes em ambos os óleos em quantidades vestigiais.

Como fonte de ácidos gordos livres de cadeia média, utilizaram-se o ácido caprílico ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$; MM 144,21 g mol⁻¹) e o ácido cáprico ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$; MM 172,26 g mol⁻¹), ambos com grau de pureza superior ou igual a 98%, da TCI Europe N.V., Bélgica.

3.1.4. Reagentes

Os principais reagentes utilizados para a execução do presente trabalho prático foram os seguintes:

- 2',7'- diclorofluoresceína, da Fluka;
- Acetona *p.a.*, da Fisher Scientific;
- Ácido acético *p.a.*, da Fisher Scientific;
- Ácido sulfúrico concentrado, da Riedel-de-Haën;
- Clorofórmio *p.a.*, da Fisher Scientific;
- Etanol 96 % (v/v), da Panreac Química S.L.U.;
- Éter de petróleo *p.a.*, da Fisher Scientific;
- Éter etílico *p.a.*, da Fisher Scientific;
- Iso-octano *p.a.*, da Fisher Scientific;
- Metanol anidro *p.a.*, da J.T. Baker;
- Monononadecanoína (99 %), da Larodan AB;
- *n*-Heptano *p.a.*, da Fisher Scientific;
- *n*-Hexano 95 % (v/v), da Fisher Scientific;
- N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamida - MSTFA (> 90 %), da TCI Europe N.V.;
- Piridina *p.a.*, da Panreac Química S.L.U.;
- Sulfato de sódio anidro, da Panreac Química S.L.U.;
- Tetra-hidrofurano *p.a.*, da Sigma-Aldrich.

3.1.5. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados para a execução do presente trabalho prático foram os seguintes:

- Balança de precisão (máximo 183 g), modelo 870 da Kern;
- Banho termostático com refrigeração, modelo RTE-200, da Neslab;
- Bomba de vácuo para filtração, modelo MZ 2C, da Vacuubrand;
- Cromatógrafo Gasoso Capilar, Finnigan TRACE GC Ultra, equipado com injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation, munido de uma coluna Trace TR-FAME com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme e de um detetor de ionização de chama;
- Cromatógrafo Gasoso Capilar, Agilent Technologies 7820A, equipado com injetor on-column da Agilent Technologies, munido de uma coluna DB5-HT com 15 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de filme e de um detetor de ionização de chama;
- Cabeça termostática, da Julabo ED;
- Estufa de secagem, WTB Binder 7200, T_{máx}=300°C;
- Evaporador Rotativo de Vácuo, Rotavapor R-200, da Büchi;
- Lâmpada visível nos UV (254 nm), da CAMAG;
- Placas de agitação magnética, das marcas Variomag Compact e Velp Scientifica;
- Placa de agitação magnética com aquecimento, da Velp Scientifica;

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação dos produtos de oxidação dos óleos

Os produtos de oxidação presentes nos óleos de argão e de grinha de uva foram determinados por espectrofotometria no ultravioleta de acordo com o método descrito no anexo IX do Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho de 1991. Esta análise pode fornecer indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda, sobre o seu estado de oxidação e sobre as modificações que possam ter ocorrido durante o processo tecnológico e o armazenamento.

A determinação das absorvâncias no UV nos comprimentos de onda 232 e 270 nm permite detetar respectivamente a presença de sistemas diénicos e triénicos conjugados, o que indica a existência de produtos de oxidação primária (hidroperóxidos) e produtos de oxidação secundária (aldeídos, cetonas e ácidos gordos de cadeia curta).

Para a análise do óleo de argão e óleo de grinha de uva por espectrofotometria no UV, começou-se por pesar rigorosamente 0,10 g da amostra em um balão volumétrico de 10 mL, que deve estar perfeitamente homogénea e isenta de impurezas em suspensão. De seguida afere-se o balão com iso-octano e homogeneiza-se.

Enche-se a tina de quartzo com a solução obtida e medem-se as absorvâncias, utilizando como referência o solvente utilizado, nos seguintes comprimentos de onda: 232, 268, 270 e 272 nm. Os valores medidos devem estar compreendidos no intervalo entre 0,1 e 0,8. Se as absorvâncias estiverem fora destes valores, torna-se necessário repetir as medições recorrendo a soluções mais concentradas ou mais diluídas. Para o valor de absorvância a 270 nm, selecciona-se o maior dos valores de absorvância, medidos nos comprimentos de onda 268, 270 e 272 nm, referente aos produtos de oxidação secundários.

Os valores das absorvâncias são expressos em termos de extinção específica (extinção de uma solução de matéria gorda a 1 g/100 mL no solvente prescrito, para um percurso óptico de 1 cm), designado por K (coeficiente de extinção).

Exprime-se a extinção específica (coeficiente de extinção) nos diferentes comprimentos de onda, de acordo com a fórmula:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c * s} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

- K_{λ} é a extinção específica no comprimento de onda λ ;
- E_{λ} é a extinção medida no comprimento de onda λ ;
- c é a concentração da solução em g/ 100 ml;
- s é a espessura da tina em centímetro.

3.2.2. Ensaios de acidólise enzimática

Os ensaios de interesterificação por acidólise enzimática foram realizados em sistema descontínuo e em meio livre de solvente, à pressão atmosférica e sob agitação magnética.

As reações ocorreram em reatores cilíndricos de vidro de parede dupla, com capacidade de 25 cm³ (figura 8).



Figura 8. Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm³) sob agitação magnética.

No interior da parede dupla dos reatores circulava água, aquecida através de um banho termostatzado, de modo a manter a temperatura dos ensaios estável e controlada.

O meio reacional de todos os ensaios foi o óleo de argão ou o óleo de grainha de uva e o ácido caprílico (C8:0) ou o ácido cáprico (C10:0). Começou-se por adicionar ao reator

3,26 g de óleo de argão ou óleo de graminha de uva e 1,08 g de C8:0 ou 1,29 g de C10:0, de forma a respeitar uma razão molar TAG:AGL de 1:2. Após a mistura estar completamente fundida, recolheu-se com uma micropipeta uma amostra de 0,10 mL às 0 h. Posteriormente, adicionou-se a enzima imobilizada, na proporção de 5 % (m/m), em relação à massa de óleo expressa em trilinoleína (MM 879,4 g mol⁻¹). Neste caso, adicionou-se 0,15 g de rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M ou 0,15 g de rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M ao meio reacional.

De seguida, vedaram-se os reatores com rolhas de borracha revestidas a papel de alumínio, com o objetivo de minimizar as reações de oxidação.

Estas reações decorreram durante 24 horas a três temperaturas diferentes (30, 40 e 50 °C), de modo a verificar o efeito da temperatura na cinética da reação e produção de novos TAG. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Ao fim de 24 h de reação, filtrou-se o meio reacional com papel de filtro, de forma a remover o biocatalisador. O meio filtrado foi recolhido para tubos de plástico, devidamente identificados, e armazenados a – 18 °C, para análises posteriores.

3.2.3. Ensaios de estabilidade operacional

Os ensaios de estabilidade operacional dos biocatalisadores (rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M) decorreram nas mesmas condições dos ensaios de acidólise enzimática, à temperatura de 40 °C durante 24 horas. As mesmas preparações enzimáticas foram reutilizadas de forma sucessiva, de modo a averiguar a sua estabilidade operacional. Foram recolhidas amostras de 0,10 mL às 0 e 24 h de cada reação.

Após 24 h de reação, o biocatalisador foi removido do meio reacional através de filtração, com papel de filtro, e utilizado num novo ensaio com meio fresco e nas mesmas condições reacionais. Todas as amostras foram armazenadas a – 18 °C, até análises posteriores.

Com rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M realizaram-se apenas três reutilizações sucessivas (72 horas). No caso da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, realizaram-se quatro ensaios, totalizando 96 horas.

O primeiro ensaio foi usado como referência, considerando-se que ao fim de 24 horas, os biocatalisadores apresentavam 100 % da sua atividade inicial. A atividade residual no final de cada utilização foi calculada em relação ao valor de atividade inicial do primeiro ensaio. Posteriormente, foi determinado o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de cada biocatalisador nos vários meios reacionais, ou seja, o tempo de utilização após o qual a atividade do biocatalisador se reduz a 50 %. Este valor foi estimado a partir das respectivas equações dos modelos de inativação enzimática ajustados aos dados experimentais obtidos.

O ajuste dos modelos de inativação aos resultados experimentais foi realizado através do solver, uma ferramenta do *Microsoft Office Excel* para o *Windows*, com o objetivo de minimizar a soma dos quadrados dos erros entre os dados experimentais e os estimados pelo respetivo modelo. As definições da ferramenta solver foram: método de Newton; 100 iterações, precisão de 10^{-5} ; 5 % de tolerância e 0,0001 de convergência.

3.2.4. Análise dos produtos de reação

Derivatização e análise por cromatografia gasosa dos produtos de reação

Para a análise dos produtos de reação das amostras recolhidas ao longo dos diferentes ensaios, procedeu-se à derivatização das amostras, e posterior análise por cromatografia gasosa capilar.

O processo de derivatização começa por dissolver 0,10 mL da amostra a analisar em 10 mL de hexano. De seguida, transfere-se 0,25 mL desta solução para um balão de vidro periforme de 10 mL, que é colocado no evaporador rotativo, a uma temperatura de 30 °C e pressão inferior a 200 mbar, de modo a evaporar o solvente.

Após a evaporação, adicionaram-se, ao resíduo seco, 400 µL da solução do padrão interno para monoacilgliceróis (monononadecanoína, PI Mono C19), a qual foi preparada com $0,05 \pm 0,001$ g de monononadecanoína dissolvida em 20 mL de tetra-hidrofurano. À solução de padrão interno, adicionaram-se, ainda, 200 µL de piridina e 200 µL de N-metil-N-trimetil-silil-trifluoracetamida (MSTFA). De seguida, agitou-se a mistura de forma vigorosa e aguardou-se 15 minutos, à temperatura ambiente. Estas soluções foram armazenadas no frigorífico a 4 °C.

Ao fim dos 15 minutos, adicionaram-se 4 mL de *n*-heptano à mistura, sendo posteriormente analisado apenas 1 µL desta solução no cromatógrafo gasoso capilar, *Agilent Technologies 7820A*, munido de injetor on-column.

Ao longo de cada análise, o injetor e o detector mantiveram-se a 50 °C e 370 °C, respetivamente. Como gás de arraste utilizou-se o hélio a um caudal de 25 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 300 mL/min e 30 mL/min, respetivamente.

O programa de rampas de temperatura foi ajustado da seguinte forma: 50 °C durante 1 minuto; aumento para 180 °C a uma taxa de 15 °C/min; manutenção da temperatura a 180 °C durante 10 minutos; aumento para 230 °C a uma taxa de 7 °C/min; manutenção da temperatura a 230 °C durante 7 minutos; aumento para 370 °C a uma taxa de 10 °C/min; patamar final a 370 °C durante 26 minutos. Assim cada corrida demorou um total de 43 minutos.

Da análise cromatográfica das diferentes amostras, obtiveram-se os respetivos cromatogramas e “peak lists”, com as áreas dos picos e os tempos de retenção (em minuto) dos diferentes compostos existentes nas amostras.

Através dos cromatogramas é possível retirar uma série de informações importantes, como o consumo de AGL e TAG iniciais e a formação de novas espécies, tais como MAG, DAG e TAG.

Na figura 9, estão representados dois cromatogramas, o primeiro (A) referente à amostra no tempo inicial e o segundo (B) referente à amostra recolhida após 24 horas de uma determinada reação de acidólise realizada no âmbito do presente trabalho.

Primeiramente fez-se corresponder a cada pico de interesse o respetivo composto ou espécie de compostos, de acordo com o seu tempo de retenção (t_r), por comparação com padrões de referência e com os cromatogramas apresentados pela norma europeia EN 14105, abril de 2011.

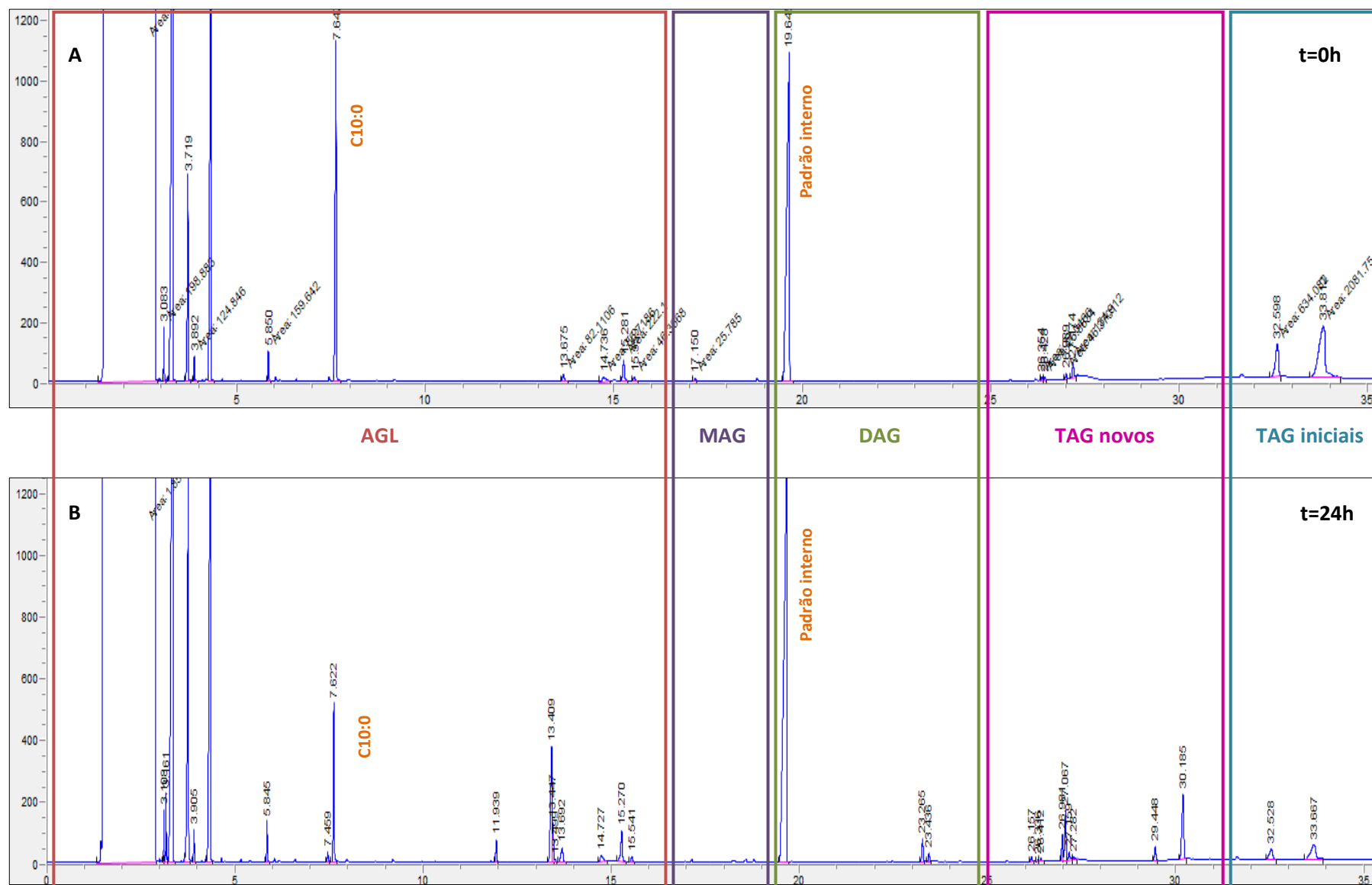


Figura 9. Cromatogramas referentes à amostra às 0 h (A) e após 24 h (B), da reação de acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de grinha de uva e o ácido cáprico, catalisada pela rROL imobilizada em LifetechTM AP1090M

Os padrões de referência utilizados foram a trilinoleína ($t_r = 34,24$ min), o padrão interno mono C19 ($t_r = 19,82$ min), o ácido caprílico ($t_r = 6,22$ min) e o ácido cáprico ($t_r = 7,86$ min).

Os conjuntos de picos referentes aos AGL, MAG, DAG e aos TAG foram reconhecidos tendo por base a norma europeia EN 14105, Abril de 2011. Os AGL têm tempos de retenção inferiores a 17 minutos, os MAG possuem um tempo de retenção compreendido entre aproximadamente 17,8 e 20 minutos, os DAG entre 20 e 25 minutos e os TAG superior a 25 minutos.

Para calcular a massa inicial e a massa ao fim de 24 horas de ácido caprílico (C8:0) e ácido cáprico (C10:0) presentes numa determinada amostra, recorreu-se às respetivas equações das curvas de calibração (figura 10).

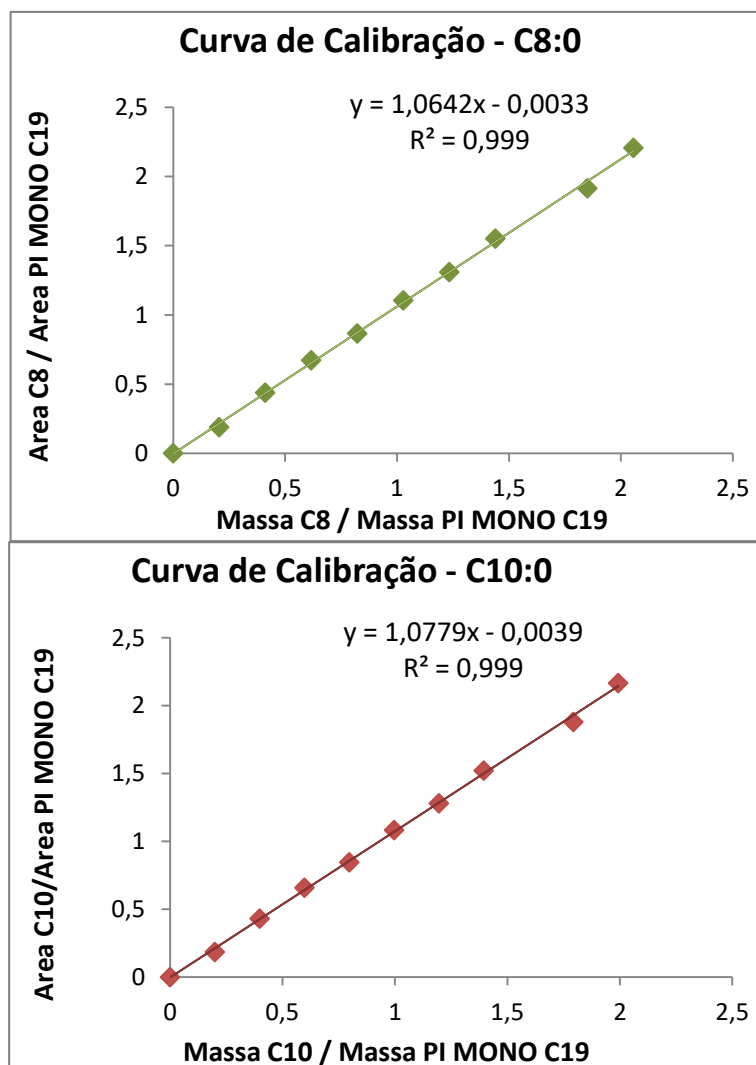


Figura 10. Curvas de calibração para o ácido caprílico (C8:0) e para o ácido cáprico (C10:0)

A curva de calibração da trilinoleína, apresentada na figura 11, foi utilizada para determinar a massa inicial e final dos TAG para cada amostra.

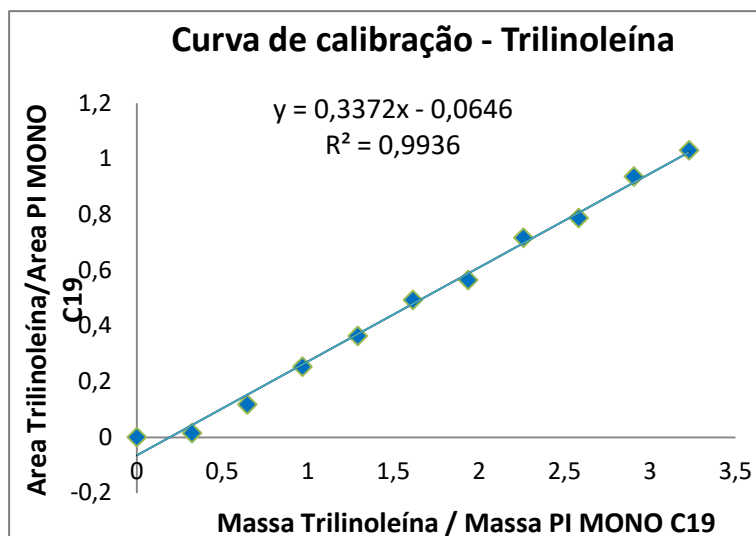


Figura 11. Curva de calibração para a trilinoleína

Assim, para calcular a massa inicial e a massa final de um determinado composto, recorreu-se à equação da curva de calibração respetiva, usando para tal a razão entre as áreas dos picos referentes ao composto e ao padrão interno, bem como a razão entre as respetivas massas.

O consumo de um dado composto obtém-se pela diferença entre a massa inicial e a massa ao fim de 24 h de reação.

O grau de conversão (% m/m) para o C8:0, C10:0 e TAG foi calculada pela razão entre a massa consumida ao longo da reação e a massa inicial do respetivo composto.

Para quantificar a formação de novos TAG, utilizou-se novamente a equação da curva de calibração para a trilinoleína (figura 11). Para tal, foi necessário calcular o somatório das áreas dos picos correspondentes aos TAG novos. A partir do somatório das áreas dos TAG, da área do padrão interno e da sua massa, calculou-se então a massa de TAG para uma determinada amostra.

O rendimento mássico (% m/m) de novos TAG foi expresso, através da razão entre a massa de novos TAG formados durante a reação e a massa de TAG presente no tempo zero da reação.

Dada a quantidade reduzida de MAG e DAG nos meios reacionais, não foi realizada a sua quantificação.

Quantificação dos ácidos gordos incorporados nos novos TAG

A determinação da quantidade de C8:0 ou C10:0 incorporados nos novos TAG foi feita em três etapas: (i) separação dos TAG da mistura reacional por cromatografia em camada fina (TLC, *Thin-Layer Chromatography*) seguida de (ii) derivatização dos TAG em ésteres metílicos dos ácidos gordos e (iii) análise por cromatografia gasosa capilar.

Assim, para determinar a quantidade de ácidos gordos incorporados nos novos triacilgliceróis, seguiu-se o procedimento, que será descrito de seguida, para cada amostra recolhida, após a reação de interesterificação.

Este processo começa por dissolver 1 mL da amostra a analisar em 5 mL de clorofórmio. De seguida, com uma micro-seringa de 100 μL , aplicam-se 300 μL da solução em banda contínua numa placa de TLC revestida com sílica gel (fase estacionária), a 1,5 cm da base da placa assim como das laterais, tal como mostra a figura 12.

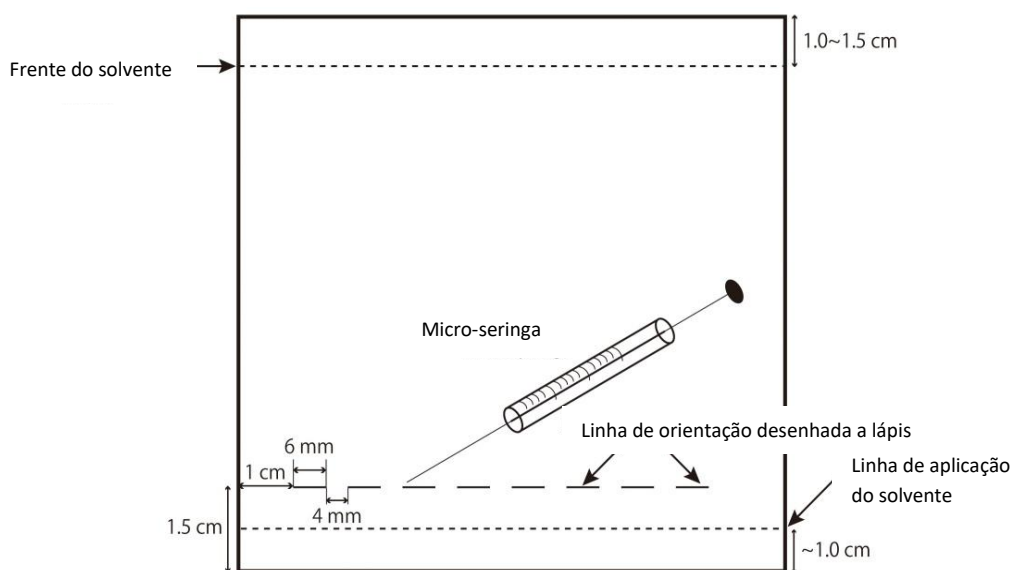


Figura 12. Representação esquemática da deposição de amostra numa placa de TLC

A placa foi colocada na vertical, numa tina cromatográfica de vidro (figura 13), com o eluente (fase móvel) composto por *n*-hexano, éter etílico e ácido acético, numa proporção de 70:30:1,5 (v/v/v), respetivamente.



Figura 13. Desenvolvimento de placas de TLC numa tina cromatográfica de vidro

O eluente deslocou-se lentamente ao longo da placa, por ação de capilaridade, processo que demorou aproximadamente 1 hora. A separação dos diferentes componentes presentes na mistura só é possível devido ao facto de alguns compostos migrarem mais que outros, consoante a maior ou menor afinidade para com a fase estacionária.

Quando o eluente chegou perto do topo da fase estacionária, a placa foi retirada da tina, e é colocada à temperatura ambiente, de modo a evaporar o solvente.

Posteriormente, a placa foi pulverizada com uma solução de 0,2 % (m/v) de 2':7' – diclorofluoresceína em etanol a 95 % (v/v), de forma a ser possível observar à luz ultravioleta, os vários grupos de compostos (triacilgliceróis, ácidos gordos livres, diacilgliceróis e monoacilgliceróis) por comparação com padrões de referência (figura 14). Neste trabalho prático foi apenas recuperada a banda dos triacilgliceróis para análise.

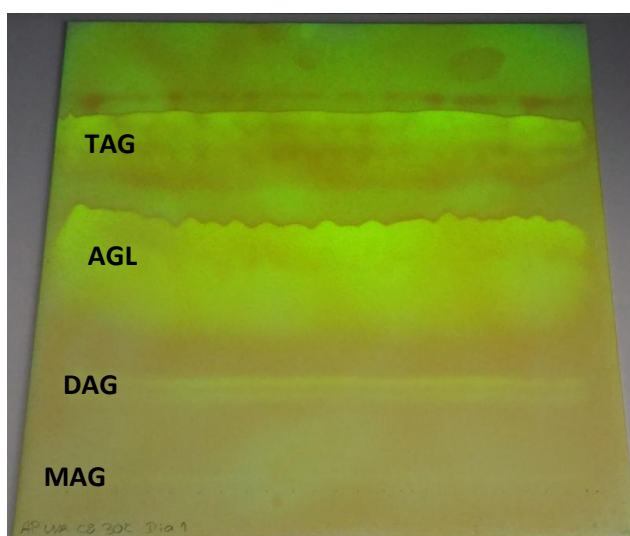


Figura 14. Exemplo de uma placa de TLC de sílica gel revelada com diclorofluoresceína, sendo visíveis os diferentes grupos de compostos

Método de metilação para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

O método de metilação utilizado para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME, *Fatty Acid Methyl Esters*) foi o descrito no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* de 1991, N°L248/47.

A banda dos TAG foi delimitada e raspada com o auxílio de uma espátula, a qual se adicionou 5 mL de reagente de metilação, composto por metanol anidro, *n*-hexano e ácido sulfúrico concentrado numa proporção de 75:25:1 (v/v/v) respetivamente.

A metilação decorreu num balão de Erlenmeyer esmerilado, ao qual foi adaptado um tubo condensador de refluxo, onde a mistura esteve em ebulição num banho a cerca de 80 °C, pelo período de 1 hora.

Ao fim dos 60 minutos, adicionaram-se à mistura 10 mL de água destilada e 10 mL de éter de petróleo. De seguida, transferiu-se a mistura para uma ampola de decantação, a qual foi agitada vigorosamente para permitir a separação de fases.

A fase aquosa (camada inferior) foi desprezada, enquanto a fase orgânica (camada superior) foi recuperada e lavada duas vezes com água destilada (2 x 10 mL). A seguir, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, de modo a remover eventuais vestígios de água.

Posteriormente, o sulfato de sódio anidro foi removido por filtração em papel, obtendo-se assim o extrato metilado que foi transferido para um balão de vidro periforme de 10 mL, que foi colocado no evaporador rotativo, a 30 °C e pressão inferior a 200 mbar, para evaporação do solvente.

Por fim, os balões de vidro periforme foram fechados e vedados com parafilme e conservados a – 18 °C, para posterior análise dos FAME por cromatografia gasosa.

Análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar

Ao resíduo seco obtido após evaporação do solvente foram adicionados 100 µL de *n*-hexano, sendo posteriormente 1 µL desta solução injetada e analisada por cromatografia gasosa.

Para a análise das amostras utilizou-se um Cromatógrafo Gasoso do modelo Finnigan TRACE GC Ultra Gas Chromatograph (Thermo Electron Corporation), equipado com uma coluna capilar Thermo TR-FAME (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm filme), um injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation (a operar em modo splitless) e um detetor de ionização por chama.

Ao longo de cada corrida, o injetor e o detetor mantiveram-se a 250 °C e 260 °C, respetivamente. Como gás de arraste utilizou-se o hélio a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 350 mL/min e 35 mL/min, respetivamente.

O programa de temperaturas foi ajustado da seguinte forma: 60° C durante 1 min; aumento para 150°C a uma taxa de 15° C/min; manutenção da temperatura a 150° C durante 1 min; aumento para 220°C a uma taxa de 5° C/min; patamar final a 220° C durante 10 min.

Da análise cromatográfica das diferentes amostras, obtiveram-se os respetivos cromatogramas e “peak lists”, com as áreas dos picos e os tempos de retenção (em minutos) dos diferentes compostos existentes nas amostras.

Primeiramente, fez-se corresponder a cada pico o respetivo ácido gordo livre, de acordo com o seu tempo de retenção (tr), por comparação com padrões de referência e com os padrões apresentados pela norma europeia EN 14105, abril de 2011.

A partir das áreas dos picos apresentadas na “peak list”, determinou-se a percentagem mássica que é calculada através da razão entre a área do pico de um AGL e o somatório das áreas dos picos de todos os AGL presentes nessa amostra.

De seguida, calculou-se o número de moles para cada AGL através da razão entre a percentagem mássica e a massa molar do respetivo AGL. Assim, é possível determinar a percentagem molar (expressa em mol-%) para cada AGL, calculando a razão entre o número de moles desse AGL e o somatório do número de moles de todos os AGL presentes na amostra.

Para calcular a incorporação molar para cada AGL nos triacilgliceróis numa determinada amostra, multiplicou-se por 100 o valor de percentagem molar obtidos para cada AGL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do estado de oxidação dos óleos

No sentido de caracterizar o estado de oxidação dos óleos utilizados, analisou-se o óleo de argão e o óleo de graminha de uva por espectrofotometria no ultravioleta, de modo a determinar os produtos de oxidação. Os resultados das absorvâncias dos produtos de oxidação primários e secundários obtidos para cada óleo encontram-se apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Valores referentes às absorvâncias dos produtos de oxidação primários e secundários para cada óleo testado

Amostra	Produtos de Oxidação Primários	Produtos de Oxidação Secundários
Óleo de Argão	0,633	0,111
Óleo de Graminha de Uva	0,712	0,326

Observando a tabela 2, verifica-se que os teores de produtos primários e secundários de oxidação presentes no óleo de graminha de uva são superiores aos teores presentes no óleo de argão. Como é sabido, a presença de produtos de oxidação provoca uma diminuição da atividade e da estabilidade das lipases (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998).

4.2. Síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM

No presente trabalho realizaram-se reações de acidólise, que foram acompanhadas ao longo de 24 horas, a diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C) e com dois óleos distintos (óleo de argão e óleo de graminha de uva). Como biocatalisador, utilizou-se a *Rhizopus oryzae* (rROL) imobilizada em dois suportes diferentes: Lifetech™ AP1090M e Lifetech™ ECR1030M.

A produção de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM foi avaliada através do rendimento em novos TAG, do consumo de ácido caprílico (C8:0) ou ácido cáprico (C10:0) e pelo consumo de TAG iniciais.

Com os resultados obtidos nesses ensaios foi possível elaborar os gráficos das figuras 15 e 16. Estes gráficos retratam o consumo do ácido gordo de cadeia média utilizado (C8:0 e C10:0) o consumo de TAG iniciais e a produção de novos TAG para as três temperaturas testadas.

A figura 15 apresenta os resultados das reações de acidólise entre o óleo de argão ou o óleo de grinha de uva e o ácido cáprico ou caprílico, catalisadas pela rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M. Relativamente à formação de novos TAG por acidólise entre o óleo de argão ou óleo de grinha de uva e o C8:0, os valores obtidos foram elevados (cerca de 80 % (m/m)) e pouco variaram com a temperatura no intervalo testado (30 a 50 °C). Quando se substitui o C8:0 por C10:0 verifica-se que a produção de novos TAG é máxima a 40 °C (cerca de 78 % (m/m)). No entanto, pouco diminui com o aumento da temperatura de 40 para 50 °C.

Através da figura 15, também é possível verificar que, em ambos os óleos testados, os consumos de C8:0 ou C10:0 e de TAG iniciais, ao longo da reação, nem sempre acompanham os aumentos observados na produção de novos TAG. Tal facto deve-se à complexidade desta reação, pois para além de novos TAG também se formam MAG e DAG a partir do C8:0 ou C10:0. O consumo de TAG iniciais pode resultar apenas na primeira etapa da acidólise, a hidrólise, que consiste na quebra das ligações éster dos TAG com libertação dos ácidos gordos de cadeia longa dos óleos e consequente formação de MAG e DAG.

Perante os resultados obtidos, pode-se afirmar que quando se usa a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M a quantidade de novos TAG é independente do tipo de óleo e do ácido gordo de cadeia média utilizado.

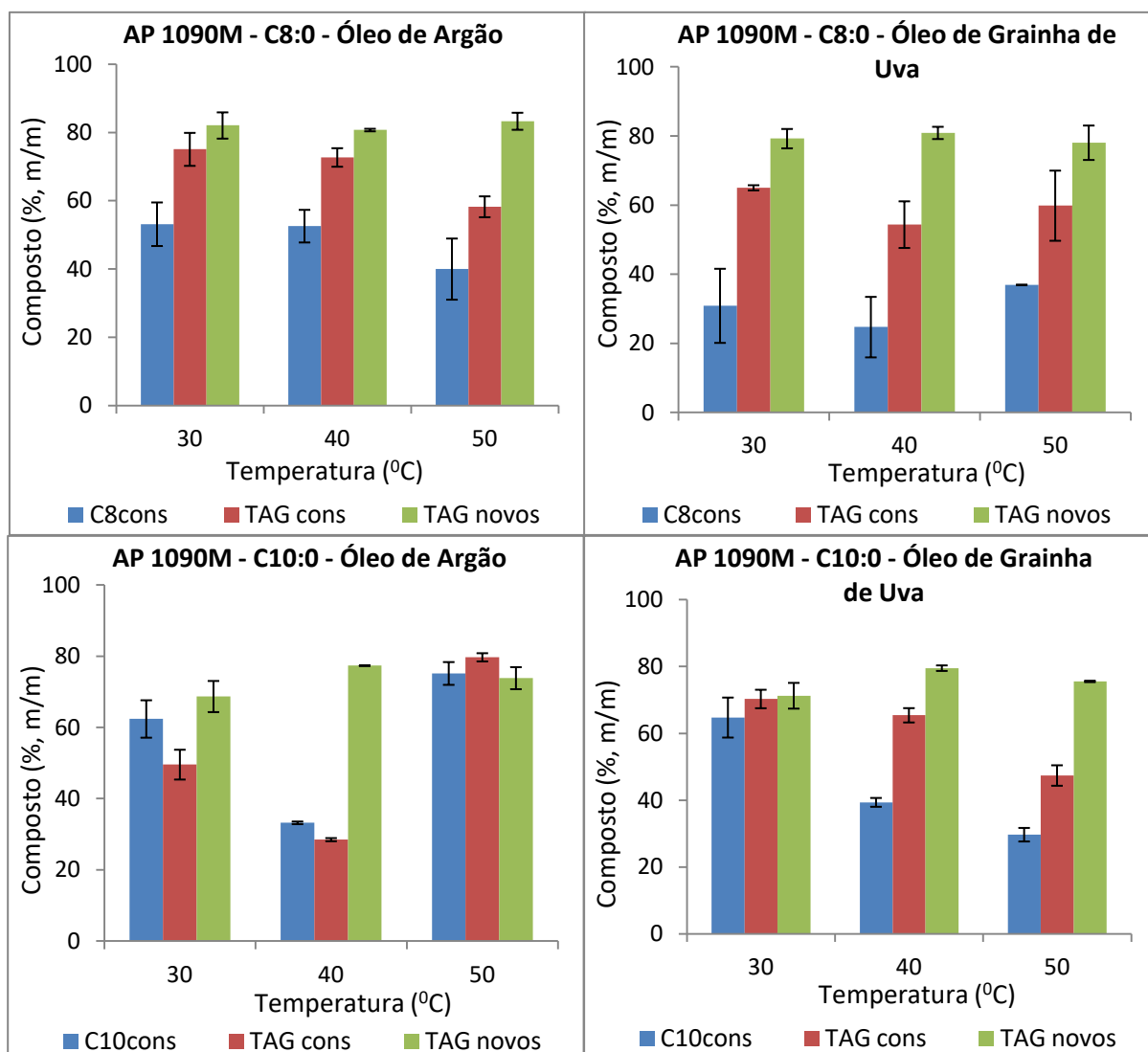


Figura 15. Cinética de acidólise: Consumo de ácido caprílico ou ácido capríco e de TAG iniciais e produção de TAG novos na reação de acidólise entre o óleo de argão ou óleo de grinha de uva e o ácido caprílico ou ácido capríco, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M

Os gráficos da figura 16 apresentam as reações de acidólise entre o óleo de argão ou o óleo de grinha de uva e o ácido cáprico ou caprílico, catalisadas pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M. Relativamente à reação de acidólise entre o óleo de argão e o C8:0, verifica-se que a produção de novos TAG aumenta com a temperatura, atingindo-se cerca de 45 % (m/m) a 50 °C. No que diz respeito ao sistema óleo de grinha de uva e C8:0, o valor de novos TAG é máximo à temperatura de 40 °C (cerca de 55 % (m/m)). Na reação de acidólise entre o óleo de argão e o ácido cáprico, atingiram-se valores de produção de novos TAG de cerca de 70 % (m/m) à temperatura de 40 °C. Quando se utilizou o óleo de

grainha de uva e C10:0 verifica-se que a produção de novos TAG é máxima a 50 °C (cerca de 60 % (m/m)).

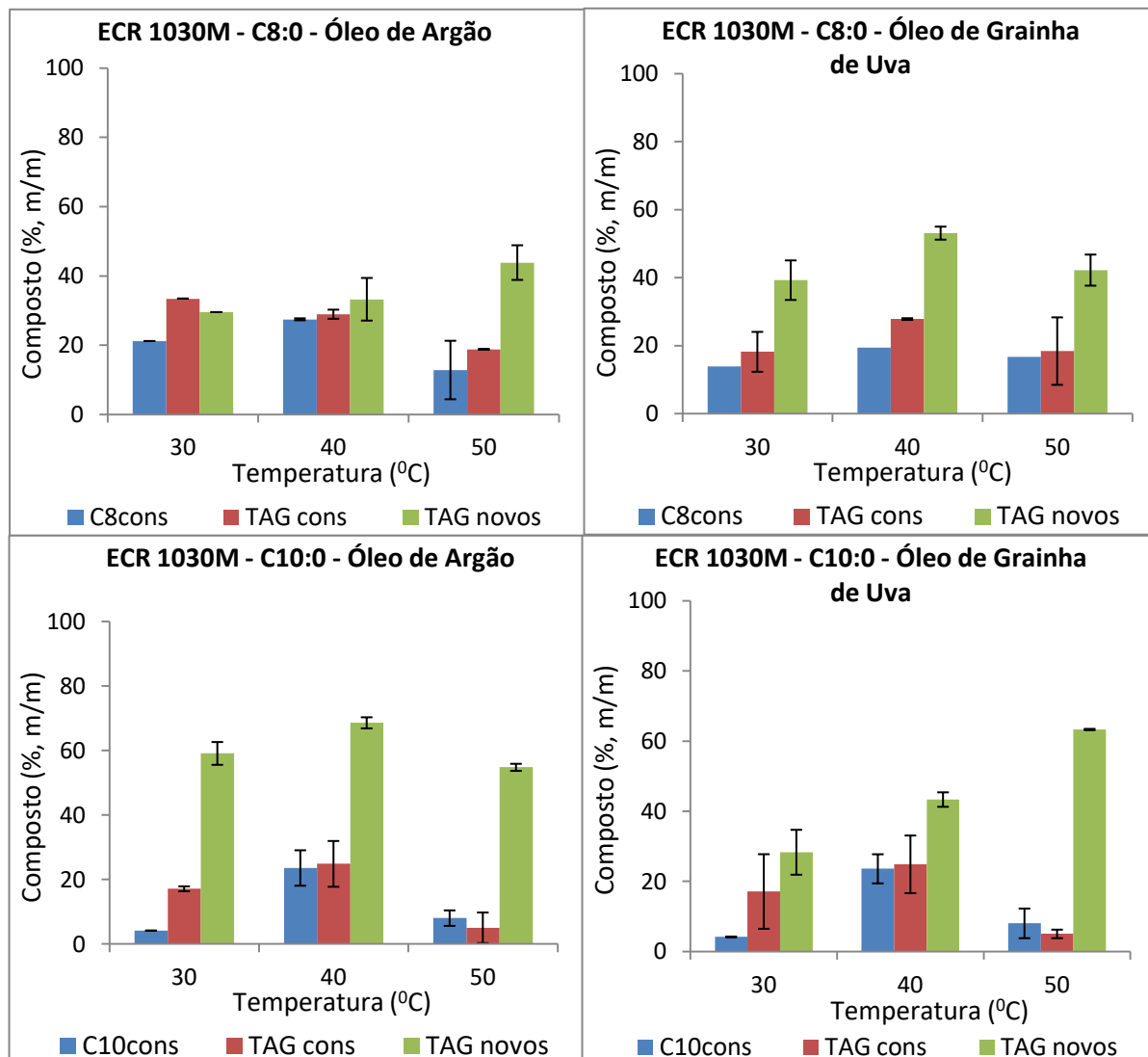


Figura 16. Cinética de acidólise: Consumo de ácido caprílico ou ácido capríco e de TAG iniciais e produção de TAG novos na reação de acidólise entre o óleo de argão ou óleo de grainha de uva e o ácido caprílico ou ácido capríco, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M

De uma forma global, pode-se verificar que o tipo de suporte utilizado na imobilização de lipase influencia a atividade catalítica da enzima. Comparando os rendimentos em novos TAG obtidos para os ensaios catalisados pela rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M com os valores obtidos nos ensaios catalisados pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, pode-se constatar que a lipase tem maior atividade quando imobilizada no suporte Lifetech™ AP1090M, visto que o rendimento em novos TAG foi sempre superior

para os sistemas com este suporte do que para os sistemas catalisados pela rROL imobilizada no suporte Lifetech™ ECR1030M.

Estes resultados podem ser explicados pelo facto do suporte Lifetech™ AP1090M apresentar poros com um diâmetro médio entre 900 e 1100 Å, ou seja, poros com um diâmetro superior aos poros do suporte Lifetech™ ECR1030M, que apresentam um diâmetro médio entre 220 e 340 Å. Isto significa que poros com um diâmetro reduzido podem contribuir para problemas de transferência de massa nas entradas dos substratos para o microambiente da lipase, levando a um menor rendimento da reação.

Geralmente, em reações de acidólise catalisadas por enzimas, um aumento da temperatura provoca uma maior solubilidade do substrato, o que se traduz numa diminuição da viscosidade do meio reacional, o que favorece a transferência de massa. Tal pode explicar parcialmente o aumento da produção de novos TAG observado à temperatura de 50 °C nas reações de acidólise entre o óleo de argão e o C8:0 e entre o óleo de graminha de uva e C10:0, catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M. Contudo, esta tendência não se verifica nas reações entre o óleo de graminha de uva e o C8:0 e entre o óleo de argão e o C10:0 na presença do mesmo biocatalisador. O aumento da temperatura reacional vai também contribuir para a inativação da enzima.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a temperatura ótima para a produção de TAG dietéticos do tipo MLM, a partir de óleo de argão e óleo de graminha de uva na presença de C8:0 e C10:0 depende do suporte utilizado.

Quando a rROL está imobilizada em Lifetech™ AP1090M, não se observa qualquer preferência relativamente aos ácidos gordos de cadeia média. Por outro lado, quando a rROL está imobilizada em Lifetech™ ECR1030M parece haver uma ligeira preferência relativamente ao C10:0.

Estudos realizados anteriormente com a rROL confirmam que se obtêm melhores resultados a temperaturas próximas de 40 °C. Nunes e colaboradores (2011) com o intuito de produzir TAG dietéticos do tipo MLM estudaram a reação de acidólise entre o azeite virgem extra e o ácido caprílico (C8:0) ou ácido cáprico (C10:0), catalisada pela rROL imobilizada em Eupergit C, à temperatura de 40 °C e em meio livre de solvente. Os valores de incorporação molar obtidos às 24 h de reação, foram de 21,6 mol-% para o C8:0 e 34,8 mol-% para o C10:0. Estes resultados demonstram a preferência da rROL pelo C10:0. No

entanto, quando testaram a mesma reação à temperatura de 25 °C obtiveram incorporações muito menores, de 12,6 mol-% para o C8:0 e 19,6 mol-% para o C10:0.

Num outro estudo realizado por Simões *et al.* (2014), utilizou-se a rROL imobilizada em Accurel MP 1000 como catalisador da reação de acidólise enzimática entre a banha e um concentrado de óleo de peixe rico em PUFA, num meio livre de solvente. Ao fim de 24 horas de reação, a lipase apresentou o maior valor de incorporação molar de PUFA (24 mol-%) para a temperatura de 40 °C e razão molar banha/PUFA 1:3.

Costa *et al.* (2017), investigaram a síntese de MLM, por acidólise entre óleo de graminha de uva e ácidos gordos de cadeia média (ácido caprílico ou ácido cáprico). Estes ensaios foram catalisados pela rROL imobilizada em Amberlite™ IRA96, em meio livre de solvente, com razão molar TAG:AGL de 1:2 a diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C). No entanto foi também à temperatura de 40 °C que se registaram maiores produções de TAG novos. Assim sendo, após 24 h de reação, obtiveram-se rendimentos em TAG novos de 68,5 % (m/m) para o C8:0 e 52,4 % (m/m) na presença de C10:0. Estes valores revelaram a preferência da rROL pelo C8:0, ao contrário do que foi observado no estudo realizado por Nunes *et al.* (2011).

4.3. Estabilidade operacional

O custo elevado das lipases juntamente com a sua baixa estabilidade operacional são as principais limitações à utilização de enzimas na indústria alimentar, especialmente na produção de óleos e gorduras. Uma forma de tornar este processo mais viável é recorrendo à imobilização das lipases, tornando estas mais estáveis e fáceis de reutilizar. De modo a escolher o melhor biocatalisador para a produção de MLM, foram realizados ensaios de estabilidade operacional.

No presente trabalho, utilizou-se como biocatalisador uma lipase não comercial, de modo a reduzir os custos associados à utilização de lipases comerciais. Contudo, um processo enzimático só é competitivo do ponto de vista económico, se o biocatalisador mantiver a sua atividade ao longo do tempo de utilização. O estudo da estabilidade operacional de um determinado biocatalisador é importante, visto que permite conhecer o seu comportamento durante reutilizações sucessivas ou em reator contínuo.

Os biocatalisadores utilizados para este estudo foram também a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M.

Os ensaios de estabilidade operacional foram efetuados em reatores descontínuos, a uma temperatura de 40 °C durante 24 horas, utilizando de forma sucessiva o mesmo biocatalisador. A escolha desta temperatura baseou-se nos resultados obtidos na cinética da acidólise (c.f. 4.2.). Apesar de se terem observado elevados rendimentos em novos TAG em alguns ensaios a 50 °C, não se escolheu esta temperatura de modo a evitar a inativação térmica dos biocatalisadores. Assim, realizaram-se três utilizações sucessivas da rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e quatro reutilizações no caso da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, na acidólise dos óleos de argão e de grinha de uva com os ácidos caprílico ou cáprico. Isto deveu-se ao facto de se ter verificado uma destruição e desagregação das partículas da enzima, por agitação magnética, dificultando a sua recuperação através da filtração em papel, e a sua posterior reutilização.

A figura 17 mostra a atividade residual da rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M ao fim de três reutilizações sucessivas para os quatro sistemas de produção de MLM.

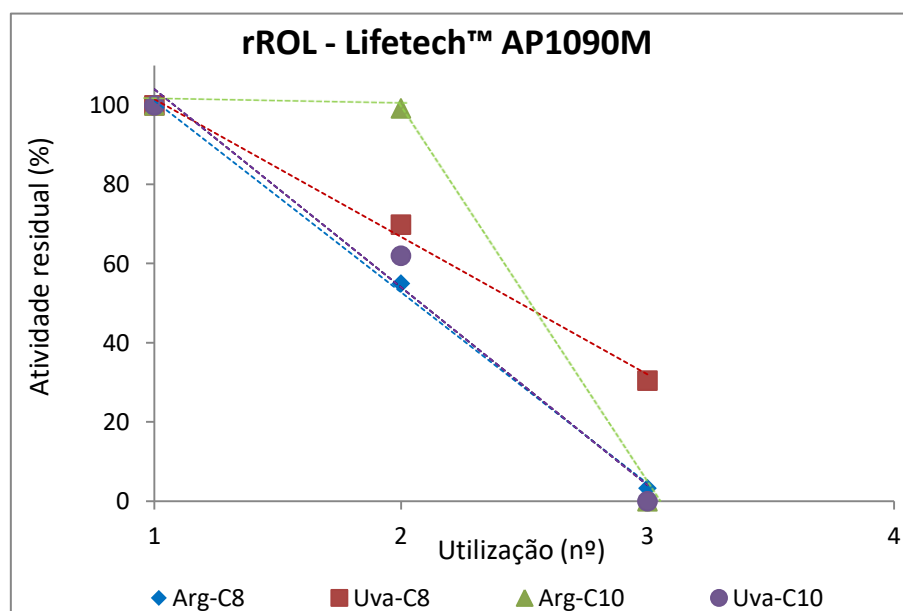


Figura 17. Atividade residual da rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M ao fim de 3 reutilizações de 24 h a 40 °C na acidólise de óleo de argão com C8:0 (Arg-C8), óleo de grinha de uva com C8:0 (Uva-C8), óleo de argão com C10:0 (Arg-C10) e óleo de grinha de uva com C10:0 (Uva-C10)

Nos sistemas de acidólise de óleo de argão e de óleo de grinha de uva com ácido caprílico (C8:0), catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M, a inativação enzimática seguiu um modelo linear. O mesmo aconteceu com a reação entre o óleo de grinha de uva e o ácido caprílico (C10:0). No entanto, quando se utilizou este biocatalisador na reação de acidólise entre o óleo de argão e o C10:0, observou-se uma inativação enzimática segundo um modelo designado de *Time Delay Model*. Este modelo apresenta um patamar inicial, onde a enzima mantém a sua atividade inicial durante os dois primeiros ensaios, diminuindo linearmente no terceiro. Ao fim da terceira utilização, a enzima tinha perdido completamente a sua atividade catalítica.

Na figura 18, encontra-se representada a atividade residual da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M ao fim de quatro reutilizações sucessivas para os quatro sistemas em estudo.

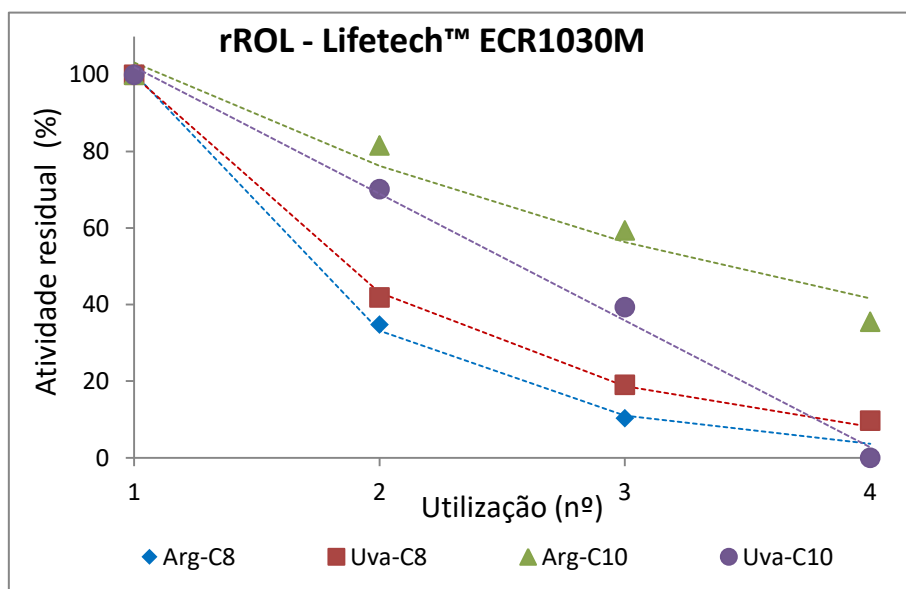


Figura 18. Atividade residual da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M ao fim de 4 reutilizações de 24 h a 40 °C na acidólise de óleo de argão com C8:0 (Arg-C8), óleo de grinha de uva com C8:0 (Uva-C8), óleo de argão com C10:0 (Arg-C10) e óleo de grinha de uva com C10:0 (Uva-C10)

Para as reações de acidólise entre o óleo de argão e o óleo de grinha de uva com ácido caprílico (C8:0) bem como para a reação entre o óleo de argão e o ácido caprílico (C10:0), catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, observou-se uma inativação enzimática segundo um modelo exponencial de primeira ordem, dado pela seguinte equação 2:

$$A_n = Ae^{-k_d n} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

- A_n é a atividade residual do biocatalisador (%) na reutilização n ;
- A é uma constante que corresponde à atividade inicial da enzima, antes da inativação;
- K_d é a constante da velocidade de inativação, expressa em (número de reutilização)⁻¹;
- n é o número da reutilização de 24h.

No entanto, quando se utilizou este biocatalisador na reação de acidólise entre o óleo de graminha de uva e o C10:0, verificou-se que a inativação enzimática seguiu um modelo linear.

Na tabela 3, encontram-se as equações dos modelos de inativação enzimática ajustados aos resultados experimentais, os coeficientes de determinação desses modelos, bem como os tempos de meia vida estimados para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e para a rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M como catalisadores de todos os sistemas em análise.

Tabela 3. Modelos de inativação enzimática para rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M nas reações de acidólise entre o óleo de argão ou o óleo de graminha de uva e o ácido caprílico ou ácido cáprico, respetivos coeficientes de determinação e tempos de meia vida

Sistema	rROL Lifetech™ AP1090M			rROL Lifetech™ ECR1030M		
	Equação	R ²	t _{1/2} (h)	Equação	R ²	t _{1/2} (h)
Argão – C8:0	$A_n = -48,35n + 149,47$	0,9984	49,9	$A_n = 303,4e^{-1,11n}$	0,9974	39,1
Uva – C8:0	$A_n = -34,762n + 136,3$	0,9941	59,6	$A_n = 230,32e^{-0,84n}$	0,9946	43,8
Argão – C10:0	$A_n = -99,23n + 297,69$	0,8243	84,0	$A_n = 139,72e^{-0,3n}$	0,9968	81,4
Uva – C10:0	$A_n = -50n + 154$	0,9811	49,9	$A_n = -33n + 135$	0,9954	55,0

Atráves da tabela 3, pode observar-se que os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) estimados variaram entre 39 e 84 horas.

A rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M apresentou uma estabilidade operacional ligeiramente superior à rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M principalmente para os sistemas com C8:0. Nos sistemas com C10:0, os tempos de meia vida foram semelhantes para ambas as preparações enzimáticas.

Os valores de estabilidade mais elevados foram obtidos para os sistemas de óleo de argão e C10:0, com tempos de meia vida de 84 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e de 81 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M. Já os sistemas de óleo de grinha de uva e C10:0, apresentaram valores inferiores, com tempos de meia vida de 50 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e de 55 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M.

Apesar do óleo de grinha de uva apresentar maiores teores de produtos de oxidação, nem sempre se verificaram menores valores de estabilidade operacional de ambos os biocatalisadores quando em presença deste óleo.

Nunes *et al.* (2011) investigaram a estabilidade operacional da rROL imobilizada em Eupergit C na reação de acidólise entre o azeite e o ácido caprílico (C8:0) ou ácido cáprico (C10:0). Os ensaios foram realizados a 40 °C, em meio livre de solvente, com razão molar TAG:AGL de 1:2, durante 13 reutilizações sucessivas de 24 h cada. A rROL revelou ter maior estabilidade operacional na presença de ácido caprílico, registando-se um tempo de meia vida de 159 horas, em vez de na presença de ácido cáprico, com um tempo de meia vida de 136 horas.

Simões e colaboradores (2014) avaliaram a estabilidade operacional da rROL imobilizada em Accurel MP 1000 para a produção de substitutos de gordura do leite humano (HMFS) por acidólise entre a banha e um concentrado de óleo de peixe rico em PUFA, num meio livre de solvente. Os ensaios de estabilidade operacional decorreram a 40 °C, em meio livre de solvente, com razão molar banha/PUFA 1:3, durante 7 reutilizações sucessivas de 24 h cada. Neste estudo, o tempo de meia vida estimado para o biocatalisador foi de 112 h.

Também Costa *et al.* (2017), investigaram a estabilidade operacional da rROL imobilizada em Amberlite™ IRA96, na reação de acidólise entre óleo de grinha de uva e o ácido caprílico (C8:0) ou ácido cáprico (C10:0). Os ensaios foram realizados a 40 °C, em meio livre de solvente e com razão molar TAG:AGL de 1:2. Cada reutilização teve a duração

de 48 h, num total de 5 reutilizações. Obtiveram-se tempos de meia vida de 166 h na presença de ácido caprílico e 118 h na presença de ácido cáprico. Estes resultados demonstraram uma maior estabilidade operacional da rROL em presença de C8:0.

O tipo de suporte utilizado na imobilização da mesma lipase (rROL) vai pois condicionar a sua estabilidade operacional. As diferentes características físico-químicas dos suportes vão criar diferentes condições no microambiente da enzima as quais vão determinar a sua atividade catalítica e estabilidade operacional.

Incorporação de C8:0 e C10:0 nos TAG

O grau de incorporação de ácidos gordos de cadeia média incorporados nos novos TAG, obtidos ao longo dos ensaios de estabilidade operacional encontram-se nas figuras 19 e 20.

A figura 19 mostra a incorporação molar do C8:0 ou C10:0 em presença da rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M, ao longo de três reutilizações sucessivas de 24 h à temperatura de 40 °C.

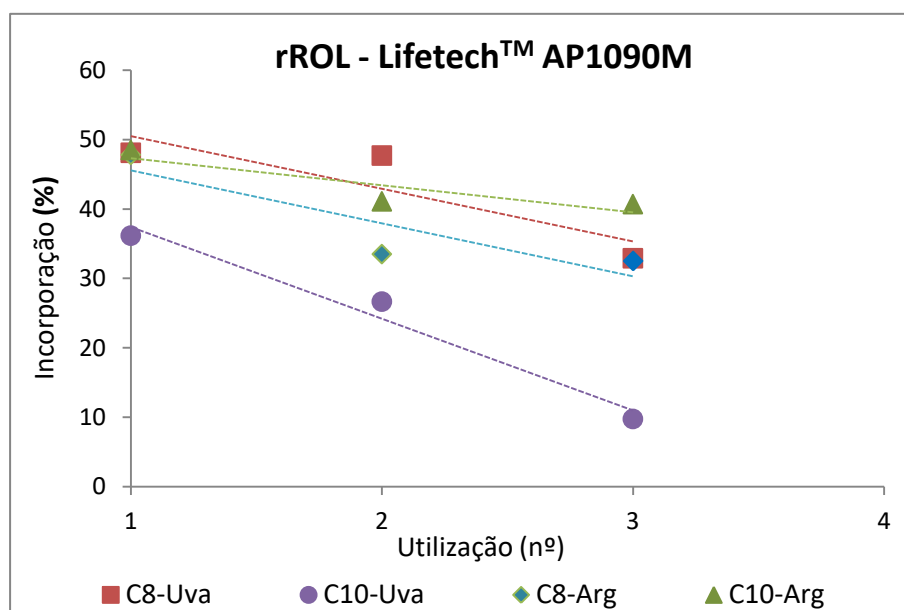


Figura 19. Incorporação molar (%) do C8:0 ou C10:0 nos novos TAG em presença de rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M ao longo de 3 reutilizações de 24 h a 40 °C

Na figura 20, encontra-se representada a incorporação molar do C8:0 ou C10:0 em presença da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, ao longo de três reutilizações sucessivas de 24 h à temperatura de 40 °C.

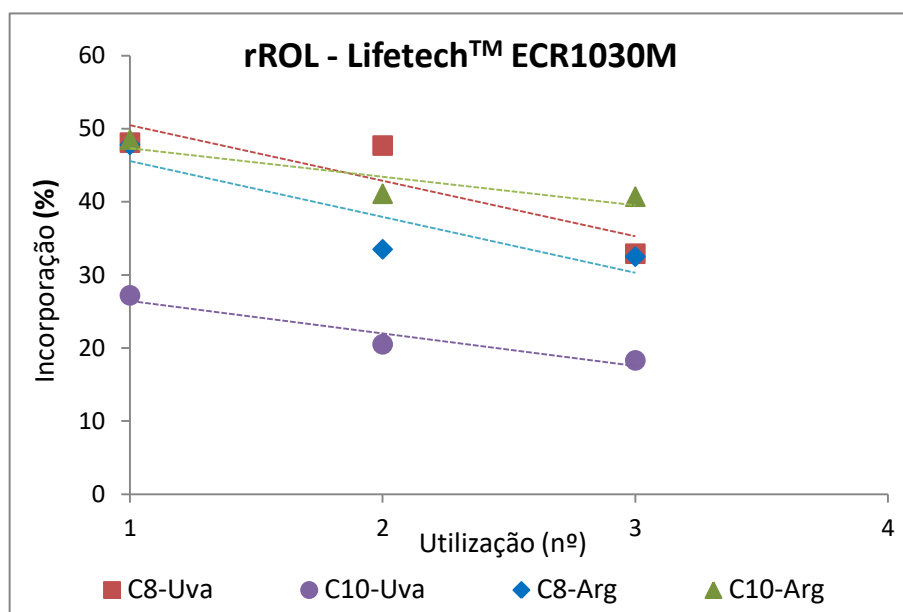


Figura 20. Incorporação molar (%) do C8:0 ou C10:0 nos novos TAG em presença de rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M ao longo de 3 reutilizações de 24 h a 40 °C

Observando as figuras 19 e 20, verifica-se que tanto os sistemas catalisados pela rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M como os sistemas catalisados pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M apresentam valores de incorporação de C8:0 ou C10:0 bastante semelhantes. No entanto, o sistema óleo de grinha de uva – C8:0 apresentou menores valores de incorporação quando comparado com os outros sistemas. Em todos os sistemas verifica-se uma diminuição linear da incorporação ao longo dos ensaios de reutilização.

5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões gerais

O trabalho desenvolvido no âmbito da presente tese incidiu no estudo da reação de acidólise enzimática entre o óleo de argão ou o óleo de grinha de uva e o ácido caprílico (C8:0) ou o ácido cáprico (C10:0), com o intuito de produzir lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM.

O biocatalisador utilizado foi uma enzima não comercial *sn*-1,3 seletiva, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL), expressa numa estirpe mutante de *Pichia pastoris* e imobilizada em dois suportes diferentes: Lifetech™ AP1090M e Lifetech™ ECR1030M.

As reações ocorreram em reatores descontínuos, em meio livre de solvente, durante 24 horas, a diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C), utilizando uma razão molar de TAG:AGL de 1:2 e uma carga de enzima de 5 % em relação à massa de óleo.

Os rendimentos em TAG novos obtidos para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M foram de cerca de 80 % (m/m) para os sistemas com o C8:0 e 78 % (m/m) para os sistemas com C10:0. Estes valores pouco variaram com a temperatura no intervalo testado (30 a 50 °C). Nos ensaios catalisados pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M atingiu-se um rendimento em TAG novos de cerca de 45 % (m/m) a 50 °C para a reação de acidólise entre o óleo de argão e o C8:0. No que diz respeito ao sistema óleo de grinha de uva e C8:0, o valor de novos TAG é máximo à temperatura de 40 °C (cerca de 55 % (m/m)). Na reação de acidólise entre o óleo de argão e o ácido cáprico, atingiram-se valores de produção de novos TAG de cerca de 70 % (m/m) à temperatura de 40 °C. Quando se utilizou o óleo de grinha de uva e C10:0 verifica-se que a produção de novos TAG é máxima a 50 °C (cerca de 60 % (m/m)).

Perante estes resultados, a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M parece ser o biocatalisador mais adequado para a síntese de lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM.

Implementaram-se ensaios de estabilidade operacional que decorreram à temperatura de 40 °C durante 24 horas, em reatores descontínuos, reutilizando de forma sucessiva o mesmo biocatalisador. Assim, realizaram-se 3 utilizações sucessivas para a rROL

imobilizada em Lifetech™ AP1090M e 4 reutilizações no caso da rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M.

Nos sistemas de acidólise de óleo de argão e de óleo de graminha de uva com o C8:0 catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M, a inativação enzimática seguiu um modelo linear, assim como a reação entre o óleo de graminha de uva e o C10:0. No entanto, na reação de acidólise entre o óleo de argão e o C10:0, observou-se uma inativação enzimática segundo um modelo designado de *Time Delay Model*. Na acidólise catalisada pela rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M, verificou-se uma inativação segundo um modelo exponencial de primeira ordem para os quatro sistemas em estudo.

Os tempos de meia vida variaram entre 39 e 84 horas, tendo-se verificado maiores valores de estabilidade operacional na presença de ácido capríco, nomeadamente para os sistemas de óleo de argão e C10:0. Para este sistema, obtiveram-se tempos de meia vida de 84 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M e de 81 horas para a rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M. Face aos resultados obtidos, pode constatar-se que a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M apresentou uma estabilidade operacional ligeiramente superior à rROL imobilizada em Lifetech™ ECR1030M.

Assim, concluiu-se que o melhor sistema para a síntese de TAG dietéticos do tipo MLM, foi o óleo de argão e C10:0 e a rROL imobilizada em Lifetech™ AP1090M parece ser a lipase mais adequada para catalisar esta reação, pois foi a que apresentou maiores rendimentos em TAG novos e maior estabilidade operacional, para os meios reacionais e condições de ensaio estabelecidos.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

No sentido de complementar o estudo realizado no âmbito da presente tese, sugere-se que no futuro se desenvolvam trabalhos baseados nos seguintes aspetos:

- Realizar as reações de acidólise enzimática com outros óleos, como por exemplo óleo de girassol, óleo de bagaço de azeitona, óleo de amendoim, óleo de bolota ou óleo de algas;

- Investigar a imobilização da rROL noutros suportes e estudar diferentes razões carga de lipase/suporte;
- Investigar o efeito da razão molar TAG:AGL na cinética da reação;
- Testar outras lipases imobilizadas, de modo a encontrar enzimas com elevada atividade e estabilidade operacional e com menores custos do que as lipases comerciais;
- Estudar os diversos fatores que afetam a atividade e estabilidade operacional das lipases, como por exemplo a atividade da água, a pressão e a presença de ácidos gordos livres e pigmentos;
- Implementar o sistema reacional em contínuo, uma vez que a migração de grupos acilo se pode tornar problemática quando se trabalha com reatores em “batch” sucessivos, com consequente formação de produtos indesejados. O processo contínuo permite ainda a reutilização de lipases imobilizadas, sem necessidade de as separar do meio reacional, o que se traduz numa redução de custo e tempo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz, D., Budde, H., Wehtje, E., (2002), Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction, *Biotechnology and Bioengineering*, 78: 403-411.
- Ahern, T. J., Klivanov, M., (1985), The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C, *Science*, 228: 1280-1284.
- Akoh, C. C., (1998), Structured lipids, *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, (Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 699-727.
- Akoh, C. C., Lee, K. T., (1998), Structured lipids: Synthesis and applications, *Food Reviews International*, 14 (1): 17-34.
- Akoh, C. C., Min, D. B., (2002), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2nd edition, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1014.
- Akoh, C. C., Kim, B. H., (2015), Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids, *Journal of Food Science*, 80: 1713-1724.
- Babayan, V. K., (1987), Medium chain triglycerides and structured lipids, *Lipids*, 22: 417-420.
- Bailey, J. E., Ollis, D. F., (1986), Applied enzyme catalysis, *Biochemical Engineering Fundamentals*, (Verma, K., Martin, C.C.), McGraw-Hill International Editions, pp. 157-227.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., (2002), *Biochemistry*, 5th edition, W H Freeman, New York, section 12.2.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1991), Triglyceride interesterification by lipases, *Biocatalysis*, 5: 145-162

- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Kiylogram-scale ester synthesis of acyl donor and use in lipase-catalyzed interesterification, *JAOCS*, 69 (10): 966-973.
- Cambou, B., Klibanov, A. M., (1984), Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media, *Journal of the American Chemical Society*, 106: 2687-2692.
- Campos, L., (1998), *Entender a Bioquímica: o Metabolismo Fundamental em Animais e Plantas*, Escolar Editora, Lisboa, pp. 290.
- Campos, P. R. B., (2010), *Acidólise enzimática de óleo de soja para obtenção de triacilgliceróis estruturados funcionais*, Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, Brasil.
- Casas–Godoy, L., Marty, A., Sandoval, G., Ferreira–Dias, S., (2013), Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*, *Biochemical Engineering Journal*, 77: 20-27.
- Correia, A. C., Ferreira–Dias, S., (1998), The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Ballesteros, A., Plou, F. J., Iborra, J. L., Halling, P., Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-76.
- Costa, C. M., Osório, N. M., Canet, A., Rivera, I., Sandoval, G., Valero, F., Ferreira–Dias, S., (2017), Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120 (1).
- Damodaran, S., Parkin, K. L., (2017), *Fennema's Food Chemistry*, Fifth Edition, CRC Press, chapter 4, pp. 184.
- DeMan, J. M., (1999), *Principles of Food Chemistry*, 3rd Edition, A.S.P.E.N Publications, chapter 2, pp. 80.

- Dünhaupt, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J. E., (1992), *Biological Reaction Engineering*, pp. 56-59.
- Dutta, S., Ray, L., (2009), Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159 (1): 142-54.
- Erickson, M. D., (1995), Interesterification, *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, (Erickson, D. R., Ed.), AOCS Press and United Soybean Board, pp. 277-296.
- Ferreira–Dias, S., (2004), *Potencialidades de Utilização das Lipases na Produção de Lípidos para a Indústria Alimentar*, Sumário da Lição de Síntese, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, pp. 3-12.
- Ferreira–Dias, S., (2010), Enzymatic production of functional fats, *Comprehensive Food Fermentation Biotechnology*, (Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C. R., Gnansounou, E., Nigam P., Eds.), vol. II, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, 19: 608-641.
- Ferreira–Dias, S., Correia, A.C., da Fonseca, M.M.R., (2003), Response surface modeling of glycerolysis catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21: 71-80.
- Ferreira–Dias, S., da Fonseca, M. M. R., (1995), Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: Effect of the water activity, *Bioprocess Eng.*, 12: 327–337.
- Ferreira–Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., Valero, F., (2013), The potencial use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries, *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458.

- Frankel, E. N., (1995), Natural and biological antioxidants in foods and biological systems, Their mechanism of action, applications and implications, *Lipid Technology*, 77–80.
- Ghazali, H. M., Hamidah, S., Che Man, Y. B., (1995), Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72: 633-639.
- Ghotra, B. S., Dyal, S. D., Narine S. S., (2002), Lipid shortenings: a review, *Food Research International* 35: 1015-1048.
- Gunstone, F. D., (2006), *Modifying Lipids for Use in Food*, CRC Press, pp.624.
- Hamam, F., (2013), Specialty Lipids in Health and Disease, *Food and Nutrition Sciences* 4, pp. 63-70.
- Hernqvist, L., (1990), Polymorphism of Triglycerides a Crystallographic Review, *Food Structure*: Vol. 9: No. 1, Article 5.
- Holm, H. C., Cowan, D., (2008), The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 679-691.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., (2004), Lipases and their industrial applications: an overview, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118 (1-3): 155-70.
- Howlett, J., (2008), *Functional Foods: From Science to Health and Claims*, ILSI Europe publications, pp. 36.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T., (1998), Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16: 396-403.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi, C. J., (1992), Lipids in human milk and infant formulas, *Annual Review of Nutrition*, 12: 417-441.

- Khmelnitsky, Y. L., Levashov, A., VKlyachko, N. L., Martinek, K., (1988), Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content, *Enzyme and Microbial Technology* 10 (12): 710-724.
- Kim, B. H., Akoh, C. C., (2005), Modeling of lipase-catalyzed acidolysis of sesame oil and caprylic acid by response surface methodology: optimization of reaction conditions by considering both acyl incorporation and migration, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8033-8037.
- Kim, B. H., Akoh, C. C., (2006), Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a bench-scale continuous packed bed reactor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5132-5141.
- Klibanov, A.M., (1986), Enzymatic reactions in organic media, *Protein Engineering Application in Science, Medicine and Industry*, (Inouye M., Sarma R., Eds.), Academic Press, Orlando, pp. 341-349.
- Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., Mojović, L. V., (2004), Immobilized lipases as practical catalysts, *APTEFF*, 35: 151-164.
- Lee, J. H., Lee, K. T., (2006), Structured lipids production, In: Akoh, C.C. (Ed.), *Handbook of Functional Lipids*, CRC Press, USA, pp. 489-512.
- Linfield, W. M., (1988), Enzymatic Fat Splitting, In: Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry, (Apple White, T. H., Eds.), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, USA, pp. 131-133.
- Low, C. T., Mohamed, R., Tan, C. P., Long, K., Ismail, R., Lo, S. K., Lai, O. M., (2007), Lipase-catalyzed production of medium-chain triacylglycerols from palm kernel distillate: Optimization using response surface methodology, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 109, No. 2, pp. 107-119.
- Macrae, A. R., (1983), Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60: 291-294.

- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., Amundson, H., (1990), Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – a review, *JAOCs*, 67 (12): 890-910.
- Marangoni, A. G., (2005), *Fat Crystal Networks*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 872.
- Marangoni, A. G., Rousseau, D., (1995), Engineering of triacylglycerols: the role of interesterification, *Trends in Food Science and Technology*, 6 (10): 329-335.
- Martinek, K., Semenov, A. N., A. N., Berezin, I. V., (1981), Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems, *Biochimica et Biophysica Acta*, 658: 76-89.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., (2007), Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1451-1463.
- Moreno, P. A., Medina, A. R., Rubio, F. C., Páez, B. C., Grima, E. M., (2004), Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes, *Biotechnology Progress*, 20: 1044-1052.
- Nascimento, A. C., Tecelão, C. S. R., Gusmão, J. H., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S., (2004), Modelling lipase-catalysed transesterification of fats containing n-3 fatty acids monitored by their Solid Fat Content, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 599-612.
- Nawar, W. W., (1996), Lipids, *Food chemistry*, 3th Edition, (FENNEMA O. R. Eds.), Dekker, New York, USA, pp. 225-319.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., (2005), *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edition, W H Freeman, New York, section 10.

- Norlelawati, A., Koh, S. P., Kamariah, L., Tan, C. P., Mohd, S., Affandi, Y., Lai, O. M., (2010), Modeling and optimization of Lipozyme RM IM-catalyzed esterification of medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) using response surface methodology, *Food and Bioprocess Technology*, doi:10.1007/s11947-010-0387-4.
- Nunes, P. A., Pires–Cabral, P., Guillen, M., Valero, F., Luna, D., Ferreira–Dias, S., (2011), Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88 (4): 473-480.
- Osborn, H. T., Akoh, C. C., (2002) Structured Lipids – Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 110-120.
- Osório, N. M., da Fonseca, M. M., Ferreira–Dias, S., (2006), Operational Stability of *Thermomyces lanuginosa* Lipase during Fats Interesterification in Continuous-Packed-Bed Reactors, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 545-553.
- Osório, N. M., Ferreira–Dias, S., Gusmão, J. H., da Fonseca, M. M. R., (2001), Response surface modelling of the production of w-3 polyunsaturated fatty acids enriched fats by a commercial immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 677-686.
- Parker, K. J., Birch, G. G., (1983). Control of food quality and food analysis, *Elsevier Applied Science Publishers*, London & New York, pp. 226-229.
- Pavareash, F., Robert, H., Thomas, D., Legoy, M. D., (1992), Gas-phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes, *Biotechnology and Bioengineering*, 39: 467-473.
- Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (2007), A water activity control system for enzymatic reactions in organic media, *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 235-241.

- Pires–Cabral, P., da Fonseca, M. M. R., Ferreira–Dias, S., (2007), Modelling the Production of Ethyl Butyrate Catalysed by *Candida rugosa* Lipase Immobilised in Polyurethane Foams, *Biochemical Engineering Journal*, 33: 148-158.
- Posorske, L. H., LeFebvre, G. K., Miller, C. A., Hansen, T. T., Glenvig, B. L., (1988), Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65: 922-926.
- Quintas, A., Freire, A. P., Halpern, M. J. (2008), Bioquímica: *Organização Molecular da Vida*, Lidel – Edições Técnicas, Lda., Lisboa, pp. 449-469.
- Reetz, M. T., (2002) Lipases as practical biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 145-150.
- Ribeiro, E. P., Seravalli, E. A. G., (2007), *Química de Alimentos*, 2ª Edição, EdgardBlücher, Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, pp. 184.
- Rosevear, A., Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S., Hilger, A., (1987), Types of stability, *Immobilised Enzymes and Cells*, Bristol and Philadelphia, pp. 148-170.
- Rousseau, D., Forestière, K., Hill, A. R., Marangoni A. G. (1996), Restructing butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 73, Issue 8, pp. 963-972.
- Rousseau, D., Marangoni, A. G., (2002), Enzymatic interesterification, *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2nd Edition, (Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 319-381.
- Rueda, A., Seiquer, I., Olalla, M., Giménez, R., Lara, L., Cabrera-Vique, C., (2014), Characterization of Fatty Acid Profile of Argan Oil and Other Edible Vegetable Oils by Gas Chromatography and Discriminant Analysis, Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Chemistry*, Volume 2014, Article ID 843908, 8 pages.

- Sellapan, S., Akoh, C., (2001), Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalysed by Lipozyme IM60, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2071-2076.
- Simões, T., Valero, F., Tecelão, C., Ferreira-Dias, S., (2014), Production of human milk fat substitutes catalyzed by a heterologous *Rhizopus oryzae* lipase and commercial lipases, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91: 411-419.
- Souza, P. H. M., Souza Neto, M. H., Maia, G. A., (2003), Componentes funcionais nos alimentos. Boletim da SBCTA, 37 (2): 127-135.
- Srivastava, A., Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C, Shaw, J. F., (2006), *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5175-5181.
- Svensson, I., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Lipase-catalysed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69: 986-991.
- Tecelão, C., Rivera, I., Sandoval, C., Ferreira-Dias, S., (2012), *Carica papaya* latex: A low cost biocatalyst for human milk fat substitutes production, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114: 266-276.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Peilow, A. D., Macrae, A. R., (1992), Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1122: 143-146.
- Vikbjerg, A. F., Mu, H., Xu, Xuebing, (2006), Elucidation of acyl migration during lipase-catalyzed production of structured phospholipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83 (7): 609-614.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., e Haas, M. J., (2000), Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9 (4-6): 113-148.

- Wang, Y., Gordon, M. H., (1991), Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1693-1695.
- Willis, W. M., Lencki, R. W., Marangoni, A. G., (1998), Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 1-36.
- Willis, W. M., Marangoni, A. G., (1999), Assessment of lipases and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (4): 443-450.
- Wisdom, R. A., Dunnill, P., Lilly, M. D., (1987), Enzymic interesterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, 29: 1081-1085.
- Xu, X., (2000), Production of specific structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102: 287-303.
- Xu, X., (2003), Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105: 289-304.
- Xu, X., Balchen, S., Hoy, C. E., Adler-Nissen, J., (1998), Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (2): 301-308.
- Yamane, T., (1988), Importance of moisture contents control for enzymatic reactions in organic solvents, A novel concept of "microaqueous", *Biocatalysis*, 2 (1): 1-8.
- Yang, T., (2003), Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chemistry*, 80 (4): 473-481.
- Zaks, A., Klivanov, A.M., (1985), Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82: 3192-3196.

Cibergrafia

- <http://www.purolite.com/ls-leaf/immobilized-lipase> (consultado em setembro de 2017)
- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:01991R2568-20110401&from=PT> (consultado em novembro de 2017)